Série A, N° 4.623
N° d'ordre : 5.470

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Christian LOMBART

1re THÈSE :

ETUDE BIOCHIMIQUE DES HAPTOGLOBINES DE LAPIN ET DE RAT

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

E 5 NOV 1965

Soutenues le devant la Commission d'examen

Mme CHAIX *Président*
M. TONNELAT } *Examinateurs*
M. JAYLE }

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1965

Série A, N° 4.623
N° d'ordre : 5.470

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Christian LOMBART

1re THÈSE :

ETUDE BIOCHIMIQUE DES HAPTOGLOBINES DE LAPIN ET DE RAT

2e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen

Mme CHAIX *Président*
M. TONNELAT } *Examinateurs*
M. JAYLE }

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOT	T	Analyse supérieure
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés
PRÉVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
N	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN ...	T	Biologie anim. (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédiment. (Orsay)
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)
R. LUCAS	T	Recherches physiques
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC ...	T	Biologie végét. (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéral. et Cristallogr.
J.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Phys. des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différ. et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
NORMANT	T	Synthèse organique
BÉNARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiol. végét. appliquée
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD ...	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN ...	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Technique Mathém. de la Physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN ..	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale

Zamansky	T	Mathématiques générales
Lennuier	T	Physique (M.G.P.)
Rizet	T	Génétique (Orsay)
Routhier	T	Géologie appliquée
Mme Tonnelat.	T	Physique théorique
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.)
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale
Brusset	T	Chimie systématique
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme Chaix ..	T	Chimie biologique
Mme Hurel-Py.	T	Biologie végét. (P.C.B.)
Pannetier	T	Chimie générale
Brun	T	Mécanique théorique des fluides I
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay)
Mme Dubreil .	T	Mathématiques (Agrég.)
Mme Lelong ..	T	Mathémat. II (E.N.S.)
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.)
Cotte	T	Physique électricité
J.-E. Dubois ...	T	Chimie organique
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.)
A. Michel	T	Chimie minérale (Orsay)
Olmer	T	Energétique générale
Rouault	T	Electricité (Orsay)
Gauthier	T	Mécanique appliquée
Barchewitz ...	T	Chimie physique
Brossel	T	Physique atomique
Buser	T	Physiologie comparée
Camus	T	Physiol. végét.
Castaing	T	Physique II Thermod. (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie
Moyse	T	Physiol. végét. (Orsay)
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organ.
Possompes	T	Zoologie
Pullmann	T	Chimie quantique
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay)
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique
Ville	T	Econométrie
Willemart ...	T	Chimie (P.C.B.)
Dode	T	Chimie (Orsay)
Freymann	T	Recherches physiques
Guinochet	T	Biol. végétale (S.P.C.N., Orsay)
Rollet	T	Chimie minérale
Mlle Josien ...	T	Chimie (S.P.C.N.)
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
Arnoult	T	Electronique (Orsay)
Chapelle	T	Physique I (Orsay)
Delange	T	Mathématiques I (Orsay)
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay)
Germain	T	Mécanique théorique des fluides
G. Lucas	T	Géologie
Allard	T	Chimie physique
Berthelot	T	Physique des particules fondamentales (Orsay)
Bricard	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie
Friedel	T	Phys. des Solides (Orsay)
M. Julia	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes
Lender	T	Biologie anim. (S.P.C.N., Orsay)
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin ..	T	Electrochimie
Monod	T	Chimie du métabolisme
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay)
De Possel	T	Analyse numérique
Charlot	T	Chimie analytique
Lemée	T	Ecologie végétale (Orsay)
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
M. Chatelet .	T	Chimie (P.C.B.)
Jean	T	Physique nucl. (Orsay)
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.)
Bergerard	T	Zoologie (Orsay)
Bertein	T	Electronique (Orsay)
Bouissieres ...	T	Radiochimie
Mme Couture .	T	Thermodynamique et Mécanique physique
Ellenberger ..	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique trop.
Stolkowski ...	T	Physiologie végétale
Acher	T	Chimie biologique
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.)
Beaumont		Biologie anim. (S.P.C.N.)
Blamont		Géophysique Ionosphère
Bourreau	T	Botanique
D. Curie		Physique (M.G.P.)
Durand-Delga .	T	Géologie
Freon	T	Chimie organ. (Orsay)
Heller	T	Physiologie végétale
Tortrat	T	Calcul des probabilités
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.)
Magnan		Physique électricité
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle Fourcroy		Biologie végét. (S.P.C.N.)
Mme Choquet-Bruhat		Mécanique analytique et Mécanique céleste
Mlle Veil	T	Physiologie générale
Lwoff	T	Microbiologie
Siestrunck ...	T	Mécanique physique et expérimentale
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
Brochard	T	Physique (P.C.B., Orsay)
Cabannes	T	Mécanique générale
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay)
Mazet	T	Mécanique génér. (Orsay)
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique
Comolet		Mécanique des fluides
Corabœuf	T	Physiologie anim. (Orsay)
Delloue	T	Physique de l'exosphère
Gorenflot ...		Botanique II (Orsay)

Houillon		Biologie animale (P.C.B.)
J. Jullien		Chimie (S.P.C.N., Orsay)
Malgrange ...	T	Tech. math. de la Physique (Orsay)
Olivier		Anthropologie
Nozeran	T	Botanique II (Orsay)
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay)
Chevaugeon ..	T	Botanique (Orsay)
Kahane	T	Mathématiques (Orsay)
Samuel	T	Math. E.N.S. féminines
Kourganoff ..	T	Astronomie (Orsay)
Thiry	T	Mécanique céleste
Abeles		Physique (S.P.C.N.)
Amat	T	Physique (P.C.B.)
Auboin	T	Géologie
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.)
Brunn	T	Géologie histor. (Orsay)
Chabbal	T	Physique (M.G.P., Orsay)
Deheuvels	T	Mathémat. propé.
D'Espagnat ...	T	Physique théor. (Orsay)
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.)
Mme Gans	T	Génétique
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.)
Guilbert		Physiq. (C.U.S., Orléans)
Hupe	T	Pétrographie
Hollande	T	Biologie générale
Lions	T	Analyse numérique
Maitte	T	Chimie (P.C.B.)
Meyer		Physique propédeutique
Nicolas		Géologie appliquée
Panigel		Biologie générale
Ravier		Pétrographie
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides
Roubine		Electronique
Silber	T	Chimie (P.C.B.)
Uebersfeld ...	T	Electronique
Yvon	T	Théories physiques
Hervé	T	Mathématiques
Néron	T	Mathé. (M.P.C., Orsay)
Mme Pecker Wimel	T	Astrophysique
Balkansky		Physique (M.P.C.)
Le Corre	T	Electricité
Delcroix	T	Physique théor. (Orsay)
Gourdin		Physique théor. des hautes énergies (Orsay)
Lehmann	T	Phys. expér. des hautes énergies
Nataf	T	Physique nucl. et Radio activité (Orsay)
Echalier		Biologie animale (P.C.B.)
Barraud		Physiologie cellulaire
Lioret		Physiologie végé. (Orsay)
Dars		Géologie structurale et géologie appliquée
Camefort	T	Botanique (agrégation)
Vichniewsky ..	T	Mécanique industrielle
Blaquière		Electronique (Orsay)
Arnous	T	Physique théorique
Tatibouet		Chimie (C.S.U., Orléans)
Mallivin	T	Mathém. propé. (Orsay)
Gaudemar		Chimie propédeutique
Perez y Jorba .		Physique expé. des hautes énergies (Orsay)
David	T	Chimie (agrégat. Orsay)
Brousse	T	Mécanique théorique
Rosch	T	Astronomie
Guy	T	Physique expérimentale
Lazard		Mathématiques (M.P.C.)
P. Morel		Physique (M.P.C.)
Arsac		Programmation
Lefebvre		Chimie (M.P.C.)
Chappeville ..		Biochimie
Benoit		Physique (C.P.E.M.)
Rio		Chimie (C.P.E.M.)
Jauzein		Géologie (E.N.S.)
G. Prévost		B.V. (C.P.E.M.)
P. Favard		B.A. (C.P.E.M.)
Vilkas		Chimie (C.P.E.M.)
Mlle Ficini		Chimie (C.P.E.M.)
Lequeux		Astronomie
Cohen Tannoudji ..		Physique (M.P.C.)
Tavernier		Physique (C.P.E.M.)
Mme Roizen ..		Physique (C.P.E.M.)
M. Durand		B.A. (S.P.C.N.)
Pascaud		Physiologie
Mme Petit		B.A. (C.P.E.N.)
Brousse		Géologie (Orsay)
Cagniac		Physique agrég. (Orsay)
Leberre		Zoologie (Orsay)
Scheffer		Microbiologie (Orsay)
De Gennes		Phys. des solides (Orsay)
Riou		Phys. nuclé. exp. (Orsay)
Clauser		Chimie biol. (Orsay)
Chevalier		Physiol. animale (Orsay)
Jancovici		Physique atom. (Orsay)
Falk-Vairant .		Physique nucl. (Orsay)
Fetizon		Chimie propé. (Orsay)
Cerf		Mathématiques (Orsay)
Lurcat		Physique
Rigaudy		Chimie (S.P.C.N.)
Sigwalt		Chimie (S.P.C.N.)
Fournet		Electricité générale
Collongues ...		Chimie (C.P.E.N.)
Dubert		Biochimie
Lavorel		Biologie physico-chimique
Morel (F.)		Physiologie comparée
Talbot		Génétique chimique
Mme Nougarède		Botanique
François		Zoologie
Ivanoff		Océanographie physique
Cadiot		Chimie organique
Baruch		Physique propédeutique
Nozières		Physique générale
Bok		Physique propédeutique
Slonimski		Génétique

Secrétaire général . . R. Poullain

A MON PÈRE

A MA MÈRE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

A Madame le Professeur P. CHAIX

Qui m'a fait le très grand honneur d'accepter la direction de ce travail et de présider mon jury de thèse.

Qu'elle veuille bien agréer le témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J. TONNELAT

Qui a bien voulu accepter de faire partie du jury et dont les conseils et les critiques m'ont été d'un grand secours dans la rédaction de cette thèse.

Je lui en témoigne ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M.-F. JAYLE

Qui m'a si généreusement reçu dans son laboratoire et m'a fait l'honneur de me confier une partie d'un travail qu'il a si brillamment inauguré.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A. R.P. J. MORETTI

Qui a donné à ce travail son orientation et en a suivi la réalisation pas à pas.

Je le remercie profondément de toute l'aide qu'il m'a apportée.

A TOUS MES CAMARADES DE LABORATOIRE

MESDAMES CHEFTEL, CHOAIN ET CLOAREC

AINSI QUE MONSIEUR H. MOURAY

Qui m'ont aidé au cours de ces années et qui ont su créer par leur sympathie une ambiance agréable de travail.

JE REMERCIE TOUT PARTICULIÈREMENT MADAME DOMINGO

Dont le dévouement et l'assistance technique m'ont été si précieux.

INTRODUCTION

Depuis sa découverte en 1938 dans le sérum humain [69], l'haptoglobine a suscité de très nombreux travaux. Une méthode de dosage de cette glycoprotéine a été décrite par JAYLE [42]; son équipe a successivement isolé l'haptoglobine humaine à l'état pur, déterminé ses constantes physiques, sa constitution chimique, et commencé l'étude de son métabolisme [15, 16, 17, 20, 35, 36, 37, 38].

Dès 1947, JAYLE avait signalé l'existence de deux types d'haptoglobine humaine [46]. En 1955, grâce à l'électrophorèse en gel d'amidon, SMITHIES [78] montrait qu'il existait en fait trois phénotypes qu'il appelait Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2, pour rappeler qu'ils étaient sous la dépendance de deux gènes hp^1 et hp^2. Le phénotype Hp 1-1 donne, à l'électrophorèse en gel d'amidon, une seule bande au niveau des α_2-globulines rapides. Par contre, les deux autres phénotypes donnent une série de bandes, situées entre les α_2 rapides et les α_2 lentes. Ces différentes protéines haptoglobiniques dérivent sans doute d'une même unité de base par polymérisation.

L'haptoglobine, que nous désignerons par le symbole Hp, a été trouvée également dans le sérum de la plupart des animaux, aussi bien chez les mammifères que chez des oiseaux et des poissons. En règle générale, ces haptoglobines sont apparentées au type Hp 1-1 ; en d'autres termes, elles ne donnent qu'une seule bande après électrophorère en gel d'amidon. Font exception à cette règle : le Cochon (chez qui l'haptoglobine dépend de 4 allèles) [39], un singe, Macacca Irus [2], dont l'haptoglobine serait du type Hp 2-1, et un hyracidé, le Daman, chez qui existe également un certain polymorphisme [13].

Le dosage du taux de l'haptoglobine dans le sérum de plusieurs milliers de sujets a permis d'établir que ce taux s'élève dans de nombreuses maladies, et en particulier, dans toute réaction inflammatoire du tissu conjonctif [45, 66]. On sait que Hp est synthétisée par le foie [65], mais l'étude de son catabolisme n'a pas été faite. Pour l'aborder commodément, il était naturel de travailler sur l'animal de laboratoire, le Lapin et le Rat. C'est pourquoi nous avons centré notre travail sur l'étude de l'haptoglobine chez ces deux animaux.

Dans une première partie, nous exposerons d'abord comment nous avons isolé ces deux protéines, par des méthodes différentes, car la composition du sérum de Rat est plus complexe que celle du sérum de Lapin. Nous indiquerons ensuite comment nous avons déterminé les constantes physiques et la constitution chimique de ces deux glycoprotéines. Nous comparerons nos résultats avec ceux que l'on a déjà trouvé pour les haptoglobines humaines. Enfin, dans une deuxième partie, nous étudierons le sort de ces haptoglobines chez le Lapin et le Rat. Pour l'étudier, nous les avons marquées soit par l'iode ^{131}I, soit par le tritium. Ce procédé nous a permis de calculer le taux de catabolisme de ces protéines, ainsi que les dimensions des « pool » intra et extra-vasculaires de l'haptoglobine. Nous avons enfin analysé leur forme d'élimination urinaire.

Avant d'exposer nos recherches, nous rappellerons d'abord les travaux antérieurs sur le sujet qui nous occupe.

TRAVAUX ANTERIEURS

A notre connaissance, il y a fort peu de travaux, déjà parus, relatifs à notre sujet. On a signalé plusieurs fois l'existence de Hp de Rat [3, 10, 30, 67, 74, 90] et de Lapin [7, 34, 74]. La première a été identifiée par immuno-électrophorèse [10, 29]. La deuxième a été utilisée par MORETTI et coll. [11] pour des études de métabolisme, après purification par chromatographie [57]. Nous reviendrons sur ces travaux plus loin.

Par contre, l'haptoglobine humaine a suscité de nombreuses études physiques et chimiques. De ces travaux, nous retiendrons uniquement les conséquences applicables à l'étude des Hp de Lapin et de Rat.

1) PROPRIÉTÉ

La propriété fondamentale des différentes Hp est de s'unir avec les hémoglobines pour former un complexe stable, doué d'activité peroxydasique [40, 41]. Cette propriété est à la base de l'identification des Hp et de leur dosage [42, 63].

A l'électrophorèse sur papier, les diverses Hp ont la mobilité des α_2-globulines, et leurs complexes Hp-Hb, celle des β-globulines. En gel d'amidon, on observe la même différence de migration. Les Hp animales, comme Hp 1-1 humaine, donnent une bande F α_2 située entre l'albumine et les β-globulines. Les complexes migrent sensiblement au niveau des β-globulines. Leur activité peroxydasique permet de les colorer par action sur la benzidine en présence d'eau oxygénée [38, 85].

2) DOSAGE DES HAPTOGLOBINES

Il existe deux méthodes principales de dosage de Hp. Toutes deux utilisent l'activité peroxydasique du complexe Hp-Hb. La première en date est celle de JAYLE [42]. C'est celle que nous avons

utilisée au cours de notre travail. On en trouvera la description détaillée dans la note 1. Nous donnerons simplement ici le principe de cette méthode et le mode d'expression des résultats.

Dans cette méthode, on fait agir le complexe Hp-Hb sur l'hydroperoxyde d'éthyle C_2H_5-O-OH. L'oxygène libéré oxyde IK en I^2 que l'on dose par l'hyposulfite.

Dans des conditions de température, de pH et de concentrations données, on recherche le volume V de la solution à doser qui contient la quantité nécessaire et suffisante de Hp pour saturer 0,1 ml de Hb de cheval M/80.000. Sachant que Hp et Hb s'unissent molécule à molécule, on peut écrire :

$$V \times \text{concentr. en Hp} = 0{,}1 \times \text{concentr. en Hb} \qquad (1)$$

A l'époque où l'on ignorait encore le poids moléculaire de Hp humaine, JAYLE a proposé d'exprimer la teneur d'une solution en Hp en « Index » ou indices de Hp. L'équation (1) peut s'écrire :

$$\frac{\text{Conc. molaire en Hp}}{\text{Conc. molaire en Hb}} = \frac{0{,}1}{V} = i \qquad (2)$$

Par définition, l'indice *i* est le facteur par lequel il faut multiplier la concentration en Hb (ici M/80.000) pour obtenir celle de Hp dans la solution à doser.

Cette méthode suppose que Hp et Hb s'unissent molécule à molécule, ou, tout au moins, dans un rapport connu. Nous aurons à déterminer sa valeur pour les Hp de Lapin et de Rat. Elle suppose également que toutes les Hp activent de la même façon Hb de Cheval : nous aurons à le vérifier.

3) PRÉPARATION

Il existe de nombreuses méthodes de préparation des Hp humaines. L. CLOAREC [18, 19] les a comparées au point de vue de leur rendement, de la pureté du produit final et de son état, natif ou dénaturé. De cette étude, il résulte que :

a) L'haptoglobine est une protéine très fragile : elle perd très facilement le pouvoir de s'unir à Hb, sans doute par modification de sa structure tertiaire. Dans ce cas, nous disons que Hp est « *dénaturée* ». Nous appelons protéine « *active* » celle qui a conservé le pouvoir de donner un complexe Hp-Hb doué d'une activité peroxydasique. Nous reviendrons sur ce point important dans les pages qui suivent.

b) Parmi les méthodes de préparation proposées, certaines sont à écarter parce que trop longues, ou de mauvais rendement, ou encore parce que le produit final est dénaturé. Les méthodes qui semblent préférables utilisent la DEAE-cellulose, substance échangeuse d'anions beaucoup plus douce que les résines du type Dowex par exemple. Cette remarque orientera nos propres recherches.

4) Catabolisme de l'haptoglobine

La méthode la plus courante pour suivre le sort d'une protéine dans l'organisme consiste à la marquer par l'iode ^{131}I. Grâce à elle, Moretti et coll. ont déterminé la demi-vie de Hp chez l'Homme et le Lapin [11, 61].

Avec cette même technique, on a étudié le catabolisme de l'albumine [4, 5, 21], du fibrinogène [55] et de plusieurs autres protéines plasmatiques. On a calculé le taux de catabolisme et les espaces de distribution dans l'organisme humain ou animal. Pour déterminer ces constantes, plusieurs méthodes d'analyse mathématique ont été proposées, chacune admettant au départ certaines hypothèses. Notre travail nous a conduit à les comparer et à les critiquer. Nous les énumèrerons plus loin.

CRITERES DE PURETE

Au cours de ce travail, nous avons été amené à établir un critère de pureté pour suivre le degré de purification obtenu au terme de chaque étape de la préparation.

Nous avons choisi l'électrophorèse en gel d'amidon [62, 77]. Celle-ci permet de déceler la présence de 1 % de protéines étrangères. Nous verrons que Hp de Lapin et de Rat ne donnent qu'une seule bande en gel d'amidon comme Hp 1-1 humaine, bande située entre les β-globulines et l'albumine.

Le complexe Hp-Hb correspondant ne présente, lui aussi, qu'une seule bande située au niveau des β-globulines en gel d'amidon. Elle peut être révélée par le réactif à la benzidine [85].

Pour vérifier la pureté d'une préparation de Hp, un premier test consiste à la soumettre à une électrophorèse en gel d'amidon et à révéler le gel par l'amido-schwarz. Si la protéine est pure, elle ne doit donner qu'une seule bande. Pour augmenter la sensibilité du test, on dépose dans un second gel en regard du premier la même quantité de Hp saturée par de l'hémoglobine de cheval. Après migration, on révèle une moitié du gel par l'amido-schwarz, l'autre moitié par la benzidine. Si Hp est pure, le complexe Hp-Hb ne doit présenter qu'une seule et même bande par les deux procédés de révélation.

1) Dosage

Au cours des phases successives de préparation de Hp, nous avons eu à déterminer le rendement ainsi que le degré de pureté obtenus à chaque étape.

A cet effet, il fallait pouvoir doser Hp active dans les différentes préparations. Nous avons utilisé la méthode de Jayle [42].

2) Rendement

Grâce à cette méthode, on peut mesurer le rendement d'une préparation. Ce rendement est, par définition, le rapport de la quantité de Hp active obtenue à la quantité initiale, ces deux quantités étant mesurées par la méthode de Jayle.

3) Pureté

La pureté d'une préparation de Hp est définie comme étant la proportion du poids de Hp au poids de protéines totales. On peut déterminer le taux des protéines totales par des mesures d'absorption faites à 280 mμ.

Si on adopte un coefficient d'absorbance moyen égal à 1,18, on en déduit la concentration de la préparation en g/l de protéines totales *.

Le rapport de la quantité de Hp active à la quantité de protéines totales donne en pour cent la pureté d'une préparation.

4) Pureté et activité

Jusqu'à présent, nous n'avons pas distingué entre Hp pure et Hp active.

L'haptoglobine peut être pure au regard de l'électrophorèse en gel d'amidon et cependant n'être pas totalement active. Il existe en effet des Hp partiellement dénaturées qui ont perdu leur pouvoir de former un complexe doué d'activité peroxydasique (probablement par perte partielle de leur structure tertiaire).

Connaissant le coefficient d'extinction de Hp de Lapin et de Rat, on peut, par des mesures d'absorption à 280 mμ, connaître la concentration en g/l d'une protéine considérée comme pure par le test de l'électrophorèse en gel d'amidon. D'autre part, la méthode dite d'activation de Jayle permet de calculer la concentration en Hp native. Si ces deux concentrations sont identiques, on peut affirmer que la préparation est à la fois pure et active. Nous appelons *taux d'activité* le rapport de la seconde à la première, c'est-à-dire le rapport de la teneur en Hp native à la teneur en Hp totale.

(*) Nous verrons plus loin comment nous avons établi le coefficient d'absorbance pour Hp de Lapin et Hp de Rat. Avant de le connaître avec précision, nous avons adopté celui de Hp 1-1 humaine (1,18), coefficient intermédiaire entre le coefficient d'absorbance de Hp de Lapin (1,16) et celui de Hp de Rat (1,20).

Première partie

Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines de Lapin et de Rat

CHAPITRE I

PREPARATIONS

A. — PRÉPARATION DE L'HAPTOGLOBINE DE LAPIN

1) Matériel

a) Animaux :

Les lapins sont de la race dite « fauve de Bourgogne » du centre d'élevage de Chapet (Seine-et-Oise).

b) Obtention des plasmas :

Chez un lapin normal, le taux de Hp sérique varie entre 0,1 et 0,5 g/l. Pour faire monter ce taux, on injecte aux animaux de l'essence de térébenthine par voie sous-cutanée avant de les sacrifier : 2,5 ml pour un lapin de 1 kg. Le taux de Hp passe alors à 3 (± 1) g/l au bout de 72 heures.

Les variations du taux de Hp sérique en fonction du temps ont été suivies chez le lapin pendant 16 jours. La *figure 1* schématise l'allure générale de ces variations.

L'animal est saigné lorsque le taux de Hp est élevé, c'est-à-dire entre le deuxième et le troisième jour.

Pour le prélèvement du sang, on opère de la façon suivante : on dégage la carotide du lapin, puis on injecte dans la veine marginale de l'oreille 1 ml d'une solution d'héparine à 1 ‰. On introduit alors un cathéter dans la carotide. Le sang est recueilli dans des pots à centrifuger. On centrifuge à faible vitesse (5.000 tours/minute) pendant 15 minutes. On obtient ainsi, à partir d'un lapin de 1 kg, 30 à 40 ml de plasma.

c) DEAE-CELLULOSE :

On la prépare comme suit : 20 g de DEAE-cellulose sont mis en suspension dans l'eau. Au bout d'une demi-heure, les plus fines particules qui n'ont pas sédimenté sont éliminées. On répète l'opération deux à trois fois. On décante ensuite le surnageant et on traite la masse pâteuse de DEAE-cellulose par environ 1 l de soude 0,5 N. On rend le mélange homogène à l'aide d'un agitateur magnétique. Par une brève centrifugation (2 mn) à 5.000 t/mn, on sépare de la soude surnageante la DEAE-cellulose qui forme un culot visqueux au fond des pots à centrifuger. On lave ensuite celle-ci abondamment

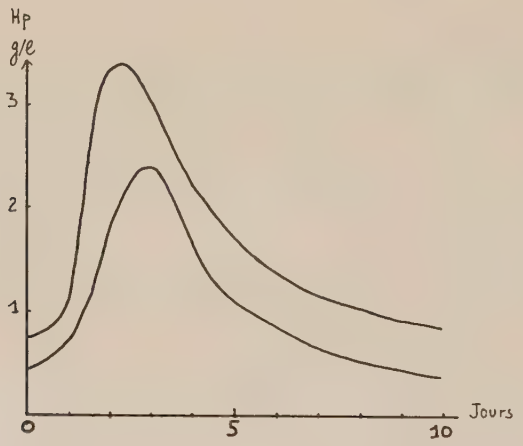

FIGURE 1 : Variation du taux de l'haptoglobine chez le Lapin, après injection d'essence de térébenthine (*d'après* H. MOURAY [64])

sur un büchner par 5 à 6 l d'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage soient revenues au pH de l'eau distillée, c'est-à-dire 5,4. On laisse ensuite la DEAE-cellulose au contact d'un tampon acétate 0,15 M à pH 5,1 pendant une nuit. Le lendemain, on ramène le pH du surnageant à 5,1 en ajoutant de l'acide acétique 0,5 N. On laisse la DEAE-cellulose reposer encore un jour et une nuit et le lendemain on mesure le pH du tampon surnageant. S'il a varié, on ajuste le pH à nouveau. Sinon, on filtre la DEAE-cellulose sur büchner et on la met dans un tampon acétate pH 5,1 de molarité 0,03 M, c'est-à-dire dans le tampon qui sera utilisé au départ de la préparation de Hp. On agite de nouveau la DEAE-cellulose pendant au moins une demi-heure pour la rendre homogène.

d) Colonnes :

Pour 100 ml de plasma contenant 2,5 à 3 g/l de Hp, on se sert de colonnes de 2 cm de diamètre, de 50 cm de hauteur, remplies aux deux tiers de DEAE-cellulose. Un tampon de laine de verre retient la DEAE-cellulose au bas de la colonne. On tasse le contenu de façon que le débit ne dépasse pas 60 ml par heure.

2) Technique

Le plasma est dialysé contre 100 fois son volume de tampon acétate 0,03 M à pH 5,1. Puis il est passé à travers une colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec le même tampon. Les γ-globulines et une partie de l'albumine ne sont pas fixées et sont entraînées dans l'effluent. Un premier lavage (tampon 0,03 M pH 5,1) élimine l'albumine restante, les α_1-globulines et une partie des β-globulines. On pratique ensuite un second lavage avec un tampon de molarité plus élevée, 0,08 M de même pH ; il entraîne des traces d'albumine, des β-globulines et une partie des α_1-globulines.

Hp est éluée en même temps que trois autres protéines par un tampon 0,15 M à pH 5,1. 400 ml environ sont nécessaires. L'éluat est alors soumis à une seconde chromatographie sur DEAE-cellulose. Hp est fixée avec un tampon 0,03 M à pH 5,1 et ensuite éluée avec un tampon 0,12 M de même pH.

3) Résultats

a) Sérum total :

En gel d'amidon (tampon borate 0,3 M pH 8,7), le sérum de Lapin donne des bandes analogues à celles du sérum humain (*fig. 2*).

b) Fractions successives :

La *figure 2* représente les électrophorèses en gel d'amidon des étapes successives de la préparation de Hp de Lapin.

d) Rendement et pureté :

Nous rappelons que le rendement des différentes étapes de préparation est, par définition, égal au rapport du poids de Hp active obtenue au poids de Hp active initiale.

Le rapport de la quantité de Hp active dosée par la méthode peroxydasique à la quantité de protéines totales présentes dans le mélange nous donne la pureté d'une préparation, exprimée en pour cent.

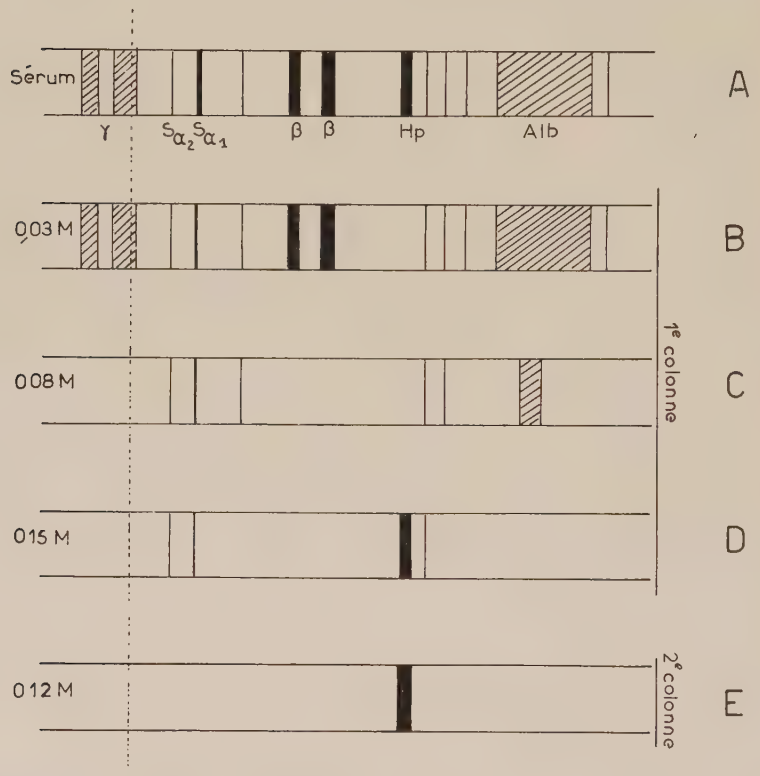

FIGURE 2 : Etapes successives de la préparation de l'haptoglobine de Lapin suivies par électrophorèse en gel d'amidon

A = Sérum initial
B = Effluent de DEAE-cellulose 0,03 M
C = Eluat de DEAE-cellulose 0,08 M } *1re colonne*
D = Eluat de DEAE-cellulose 0,15 M
E = Eluat de DEAE-cellulose 0,12 M } *2e colonne*

Bilan récapitulatif :

		Rendement	*Pureté*
— 1re colonne	tampon 0,15 M	80 %	~ 50 %
— 2e colonne	tampon 0,12 M	50 %	95 à 100 %

B. — PRÉPARATION DE L'HAPTOGLOBINE DE RAT

1) Matériel

a) Animaux :

Les rats sont des rats blancs de la souche Wistar.

b) Obtention des plasmas :

Taux de Hp sérique :

Chez le Rat normal, le taux de Hp sérique varie entre 0,1 et 0,3 g/l. Pour obtenir des taux plus élevés, on fait une injection sous-cutanée de térébenthine 48 heures avant de les sacrifier à raison de 0,5 ml par 100 g de poids d'animal.

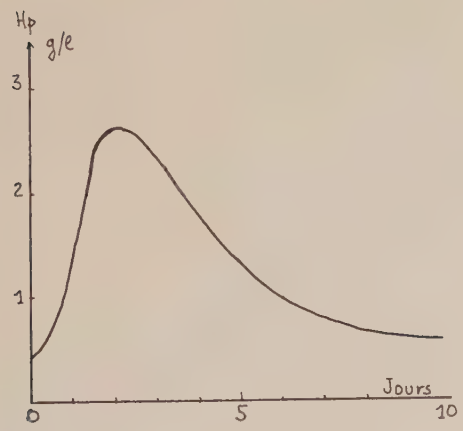

Fig. 3 : Variation du taux de l'haptoglobine sérique chez le Rat, après injection sous-cutanée d'essence de térébenthine. Allure générale

Sur un lot de 6 rats, nous avons suivi la variation du taux de Hp en fonction du temps. Les prises de sang ont été faites par ponction cardiaque et répétées toutes les 24 heures. Pendant les 6 premières heures, le taux de Hp baisse légèrement, atteint un minimum au bout de 6 heures et ensuite s'élève graduellement pour passer par un maximum au bout de 50 à 70 heures.

La *figure 3* représente la courbe de variation du taux de Hp sérique en fonction du temps.

Pour suivre ces variations, nous avions le choix entre deux méthodes de prélèvement :

1° la ponction cardiaque ;

2° le prélèvement de sang après résection de la queue.

La deuxième méthode a dû être abandonnée à cause de son action traumatisante. On sait déjà que toute agression du tissu conjonctif entraîne une augmentation du taux de Hp sérique. Or, la queue de rat est riche en tissu conjonctif. Il est donc normal que le simple fait de couper la queue du rat à intervalles réguliers fasse monter le taux de Hp sérique. Le maximum est atteint vers le deuxième jour, il décroît ensuite légèrement pour enfin se stabiliser vers le cinquième jour.

La ponction cardiaque, par contre, provoque une très légère augmentation du taux de Hp qui reste dans les limites des variations normales.

Obtention du plasma :

Pour saigner l'animal à blanc, on procède de la manière suivante : on dégage l'aorte abdominale du rat, on y introduit une aiguille à perfusion et on recueille ensuite le sang dans une seringue que l'on a auparavant enduite de silicone et rincée avec une solution d'héparine à 1 %. Le sang est aussitôt centrifugé à vitesse modérée (5.000 tours/mn) pendant 15 minutes. On obtient ainsi 5 à 6 ml de plasma à partir d'un rat de 300 g.

c) Préparation de la DEAE-cellulose :

La méthode a déjà été décrite (page 22).

d) Préparation de la TEAE-cellulose :

La TEAE-cellulose se prépare comme la DEAE-cellulose.

e) Préparation de la CMC-cellulose :

20 g de CMC-cellulose sont mis en suspension dans l'eau. On agite mécaniquement le liquide pour le rendre homogène et, au bout de 20 minutes à une demi-heure, on décante le surnageant contenant les plus fines particules encore en suspension. On répète l'opération deux à trois fois.

On traite ensuite la CMC-cellulose par de l'acide acétique 0,5 N et on observe un temps de contact d'au moins une demi-heure. Pendant tout ce temps, le mélange est soumis à une agitation mécanique. On laisse sédimenter. Le surnageant est rejeté après une courte centrifugation à 3.000 t/mn.

La pâte de CMC-cellulose est déposée sur un büchner et on la lave abondamment avec de l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage soient revenues au pH de l'eau distillée (~ pH 5,5). On laisse la CMC-cellulose en contact avec du tampon acétate 0,15 M de pH 5,1 pendant au moins une nuit. Le lendemain, on ajuste le pH avec de la soude 0,1 N. Si c'est nécessaire, on répète l'opération deux ou trois jours de suite.

Une fois la CMC-cellulose stabilisée au pH 5,1, elle est lavée avec du tampon 0,01 M pH 5,1 et conservée dans le même tampon. La CMC-cellulose est prête pour la chromatographie.

2) Essais négatifs de l'isolement de Hp de Rat

a) Précipitation par le sulfate d'ammonium :

A partir d'un sérum de Rat, par précipitation à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium à pH 7, Hp se trouve également répartie dans le surnageant et dans le précipité.

Entre 40 et 60 % à pH 7, Hp précipite avec dix autres protéines.

Cette méthode ne permet pas d'obtenir un produit pur. Elle nécessite donc une purification ultérieure. Or celle-ci, que l'on obtient par chromatographie sur DEAE-cellulose, élimine les mêmes protéines que la précipitation par le sulfate d'ammonium permet d'écarter. Ce sont les β, les γ-globulines et une partie de l'albumine. C'est pourquoi nous avons jugé inutile de passer par cette étape préalable.

b) Essai par le rivanol [81, 82] :

1 ml de sérum est dilué trois fois avec du tampon acétate à pH 5,1. Par la méthode de Jayle, on dose la quantité de Hp se trouvant dans la solution. A celle-ci, on ajoute 1 ml de rivanol 0,5 %. On élève le pH à 6 par addition de soude 0,1 N et on ajoute de nouveau 1 ml de rivanol : il ne se forme aucun précipité. Par addition de soude 0,1 N, on porte le volume de la solution à 10 ml. On atteint alors un pH voisin de 10. On ajoute 1 ml de rivanol ; il se forme un précipité dans lequel se trouve Hp.

Après lavage à l'eau distillée, on dissout le précipité dans 3 ml de tampon acétate 0,10 M à pH 5,1. On ajoute alors quelques gouttes d'une solution de NaCl saturée pour précipiter le rivanol.

Après centrifugation, on mesure l'activité peroxydasique du surnageant. L'activité totale de celui-ci ne dépasse jamais la moitié de celle du sérum initial, ce qui porte à croire que le rivanol a en partie dénaturé la protéine.

Pour confirmation, on a mesuré, d'une part l'activité peroxydasique d'un volume défini de sérum auquel on a ajouté 1 ml de sérum physiologique et, d'autre part, on a effectué le même dosage sur une même quantité de sérum auquel on a ajouté 1 ml de rivanol. Dans ce cas, l'activité du sérum additionné de rivanol ne représente plus que les 2/3 de l'activité de la solution exempte de rivanol.

La dénaturation qu'entraîne la précipitation par le rivanol ne nous permet donc pas d'envisager cette méthode pour préparer Hp.

3) Technique adoptée

Elle nécessite trois chromatographies successives, toutes trois conduites avec du tampon acétate à différents pH et à différentes molarités, avec ou sans gradient continu.

a) Chromatographie sur DEAE-cellulose :

Le plasma, dialysé 100 fois contre son volume de tampon acétate, est chromatographié sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée contre ce même tampon.

Pour 100 ml de plasma contenant 250 à 300 mg Hp, on utilise une colonne de 50 × 2,5 cm remplie aux deux tiers de DEAE-cellulose. On verse le sérum, préalablement centrifugé, dans la colonne. On lave ensuite la colonne avec 800 ml de tampon 0,03 M, puis avec 500 ml de tampon 0,06 M et on recueille l'effluent par fractions de 20 ml. On mesure les absorbances à 280 mμ et on cesse de laver la colonne dès que l'absorbance de l'effluent est descendue à 0,10. On s'assure également par dosage que les eaux de lavage n'ont pas ou très peu entraîné de Hp.

Le lavage terminé, on élue Hp avec un tampon de molarité plus élevée, 0,10 M. On entraîne ainsi un mélange de protéines, dont Hp, que l'on met ensuite à dialyser pendant une nuit contre du tampon 0,03 M à pH 5,1.

b) Chromatographie sur TEAE-cellulose :

La TEAE-cellulose est équilibrée avec le tampon 0,03 M. Pour un mélange contenant 150 à 200 mg de Hp, on utilise une colonne de 30 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre.

L'élution est effectuée avec un gradient de concentration et de pH. A cet effet, dans deux récipients cylindriques réunis par un siphon, on place respectivement 200 ml de tampon 0,03 M à pH 5,1 et 200 ml de tampon 0,2 M à pH 4,0. Un agitateur magnétique permet

d'obtenir un mélange présentant un gradient linéaire de pH et de molarité. Hp est éluée par 50 ml de tampon de molarité voisine de 0,08 M et d'un pH voisin de 4,7 * (voir schéma page 124).

Les fractions contenant Hp d'une pureté dépassant 70 % sont rassemblées et sont mises à dialyser contre du tampon 0,01 M à pH 5,1.

c) Chromatographie sur CMC-cellulose :

Après avoir équilibré la CMC-cellulose contre du tampon 0,01 M, on verse celle-ci dans une colonne de 50 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre jusqu'à atteindre une hauteur de 30 cm. On tasse ensuite la CMC-cellulose à l'aide de l'air comprimé. Le débit ne doit pas dépasser 20 ml/h. On continue d'exercer la pression pendant que filtre le mélange de protéines enrichi en Hp au travers de la colonne de CMC-cellulose.

On réalise de nouveau un gradient de concentration en tampon acétate à pH constant (pH 5,1). A cet effet, on utilise le même montage que précédemment avec des tampons 0,03 M et 0,2 M. Hp s'élue lorsque la concentration du mélange est voisine de 0,08 M. On recueille l'effluent par fractions de 10 ml.

4) Résultats

a) Analyse électrophorétique du sérum total :

Les principaux travaux faits sur le sérum de Rat [3, 10, 30, 67] montrent sa grande complexité. Par électrophorèse bidimensionnelle, on trouve plus de 20 constituants dont 7 α_1 et 5 α_2-globulines, soit 12 constituants qui, en gel d'amidon, s'échelonnent depuis les plus lents (S α_1 et S α_2) jusqu'aux plus rapides (pré-albumine).

Quantitativement, la proportion des α_1 est nettement supérieure à celle des α_2, rapport que l'on trouve inversé dans le sérum humain et dans le sérum de lapin. Parmi les α_1, deux sont particulièrement importantes . ce sont la S α_1 et l'α_1F (Beaton) ou α_1B (Boffa).

En gel d'amidon en tampon borate à pH 8,6, l'électrophorèse poursuivie pendant 12 heures et sous une tension de 6 volts/cm donne l'image suivante (*fig. 4 A*).

(*) Dans la note II, nous exposons le raisonnement qui nous a permis de calculer la molarité et le pH du mélange éluant (page 124).

b) Etapes successives de la purification :

Chromatographie sur DEAE-cellulose :

En tampon 0,03 M, l'albumine, les γ et une partie des β-globulines ne sont pas fixées.

Le tampon 0,06 M élimine une partie de l'α_1F et le reste des β-globulines. La courbe d'élution pour ce tampon ne présente qu'un seul pic.

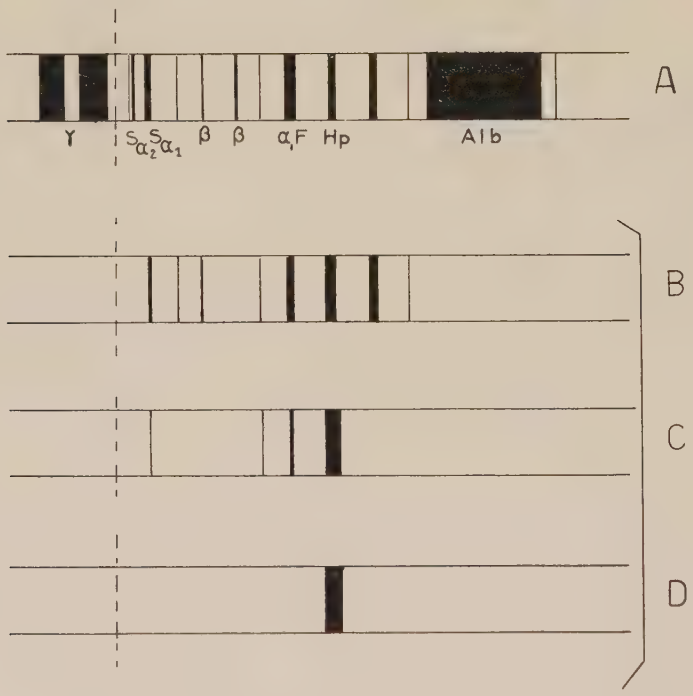

Figure 4 : Etapes successives de la préparation de l'haptoglobine de Rat, suivies par électrophorèse en gel d'amidon
A = Sérum initial
B = Eluat de la DEAE-cellulose par du tampon 0,12 M
C = Eluat de la TEAE-cellulose
D = Eluat de la CMC-cellulose

Hp est éluée par du tampon 0,12 M en même temps que 7 autres protéines caractérisées par électrophorèse en gel d'amidon (*fig. 4 B*). Il s'agit de 3 α_1, 2 α_2 et 2 β-globulines.

Le rendement de cette étape ne dépasse pas 70 % de Hp initiale et n'est jamais inférieur à 50 %. La pureté varie entre 40 et 60 %.

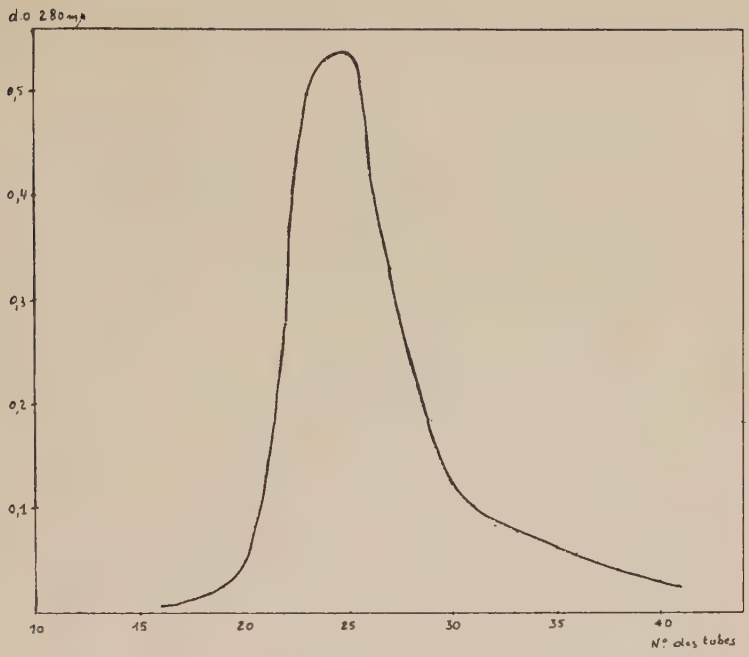

FIG. 5 : Préparation de l'haptoglobine de Rat. Chromatographie sur TEAE-cellulose. Courbe d'élution

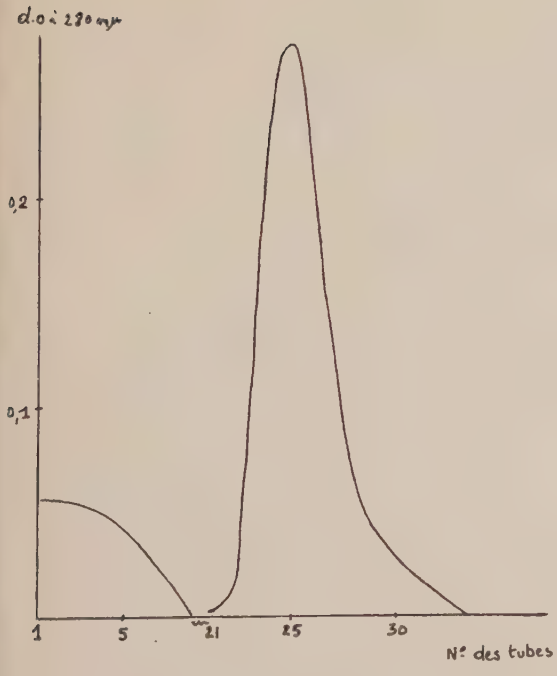

FIG. 6 (*ci-contre*) : Préparation de l'haptoglobine de Rat. Chromatographie sur CMC-cellulose. Courbe d'élution

Chromatographie sur TEAE-cellulose :

La courbe d'élution de Hp ainsi que des autres protéines qui l'accompagnent est représentée schématiquement par la *figure 5.*

Les fractions contenant 70 % de Hp ont été analysées par électrophorèse en gel d'amidon. Deux protéines en plus de Hp y sont présentes (*fig. 4 C*).

Le rendement de cette opération ne dépasse pas 60 %.

Chromatographie sur CMC-cellulose :

Les fractions enrichies en Hp de la colonne précédente sont chromatographiées sur une colonne de CMC-cellulose.

La courbe d'élution cette fois présente 2 pics dont le premier est fort arrondi (*fig. 6*). Cette première fraction contient toujours un peu de Hp, et en outre l'α_1F et 2 α_1 comme en témoigne l'analyse par électrophorèse en gel d'amidon (*fig. 4 D*).

Hp isolée après trois chromatographies successives atteint une pureté variant entre 95 et 100 %.

La seule impureté pouvant l'accompagner est constituée par une trace d'α_1F comme le montre l'analyse électrophorétique (*fig. 4 D*).

Le rendement de la dernière chromatographie est de 70 %. Au total, pour les trois chromatographies, le rendement final varie entre 25 et 35 %.

c) Bilan récapitulatif :

	Rendement partiel	*Pureté*
— Après passage sur DEAE-cellulose	50-70 %	50 %
— » TEAE-cellulose	60 %	70 %
— » CMC-cellulose	70 %	98 %

C. — CONCLUSION

Nous avons pu montrer que les Hp de Lapin ou de Rat pouvaient être isolées à l'état pur par des moyens relativement simples et exigeant un minimum de temps. Les celluloses modifiées utilisées comme échangeuses d'ions présentent l'avantage, en outre, de conserver à peu près intactes les propriétés de la molécule de Hp.

Les rendements obtenus à l'aide de ces celluloses modifiées varient entre 30 et 50 %.

CHAPITRE II

PROPRIETES PHYSIQUES

1) Coefficient d'absorbance

a) Méthode :

Une préparation de Hp très pure, contenant 1,2 à 1,5 mg de protéine par ml, est dialysée plusieurs fois contre de l'eau distillée afin d'éliminer tous les sels, puis centrifugée pendant une demi-heure à 3.000 t/mn. Sur 3 ml de cette préparation, on détermine avec grande précision (moyenne de 4 lectures) l'absorbance de la solution à 280 mμ. D'autre part, un volume connu de la même solution (environ 10 ml) mesuré avec une pipette de précision, est placé dans un creuset taré ayant séjourné pendant plusieurs jours dans un dessiccateur sous vide jusqu'à poids constant. La solution est évaporée ; laissée pendant 48 heures dans l'étuve à 115°C, elle est ensuite abandonnée dans un dessiccateur sous vide en présence de chlorure de calcium jusqu'à poids constant.

La loi de Lambert-Beer permet de calculer la valeur du coefficient d'absorbance ε, c'est-à-dire celle d'une solution contenant 1 mg/ml et pour une épaisseur de 1 cm.

b) Résultats :

Pour une longueur d'onde de 280 mμ, les valeurs de $\varepsilon \begin{matrix} 1\ g/l \\ 1\ cm \end{matrix}$ trouvées sont :

— Hp de Lapin : ε = 1,15 — 1,16.

— Hp de Rat : ε = 1,18 — 1,19.

2) Points isoélectriques

a) Méthode :

Deux techniques ont été appliquées :
— l'électrophorèse sur papier ;
— l'électrophorèse en veine liquide.

1) *Electrophorèse sur papier :*

Au même niveau que la protéine, on dépose sur la feuille de papier une goutte de subtosan, produit non polaire qui se déplace uniquement sous l'influence du courant d'électroendosmose.

Nous avons opéré en tampon acétate 0,10 M à différents pH compris entre 3,7 et 4,2. Après coloration de la protéine par l'amido-schwarz, la goutte de subtosan se détache en blanc sur fond bleu.

2) *Electrophorèse en veine liquide :*

L'appareil est celui de Perkin-Elmer n° 38. On a utilisé le tampon de Michaëlis de force ionique 0,12 à différents pH. Ces pH étaient :

— Pour Hp de Lapin 3,44 4,62 5,1
— Pour Hp de Rat ..... 3,44 4,62 4,74 et 5,12

La durée de migration est comprise entre 9.000 et 12.600 secondes.

Les conductivités des tampons ont été mesurées après dialyse dans une cellule de conductivité à électrodes de platine.

Les calculs de mobilité ont été effectués à partir de la branche descendante.

b) Résultats :

Electrophorèse sur papier :

Le pHi de Hp de Rat est compris entre 4,1 et 4,2.

Celui de Hp de Lapin est compris entre 3,8 et 3,9.

Electrophorèse en veine liquide :

Les mobilités calculées aux différents pH sont consignées dans le *Tableau I.*

Elles sont exprimées en $cm^2/volt^{-1}/sec^{-1}/10^3$.

La *figure 7* représente les courbes de mobilités respectives de Hp de Lapin et Hp de Rat en fonction du pH.

Les valeurs des pHi obtenues graphiquement sont :
— pour Hp de Lapin : 3,85 ;
— pour Hp de Rat : 4,45.

TABLEAU I : *Mobilités électrophorétiques des Hp de Lapin et de Rat en fonction du pH*

pH	*Hp Lapin*	*Hp Rat*
5,12	— 2,8	
5,10		— 2,4
4,74		— 1,1
4,62	— 2,0	— 0,8
3,44	+ 1,6	+ 3,5

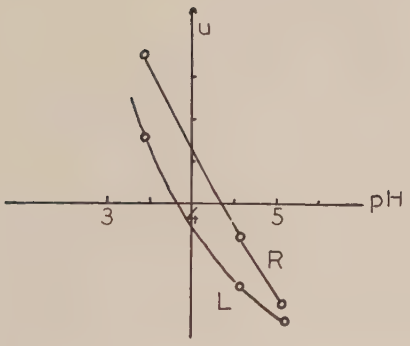

FIG. 7 : Détermination du point isoélectrique par électrophorèse en veine liquide. Variations de la mobilité électrophorétique en fonction du pH pour Hp de Lapin (L) et de Rat (R)

3) Détermination du coefficient de sédimentation

a) MATÉRIEL :

Les ultra-centrifugations ont été faites avec une ultra-centrifugeuse analytique Spinco, modèle L, tournant à la vitesse de 59.780 t/mn à 20°C.

b) DÉTERMINATION DE S :

Les déterminations de S ont été faites en tampon phosphate (pH 7,3).

Les valeurs de S ont été calculées pour trois concentrations différentes. Les différentes valeurs de S sont portées en ordonnées sur un graphique en fonction de la concentration en abscisses. Les points obtenus se situent sur une droite qui, extrapolée à dilution infinie, coupe l'axe des ordonnées pour une valeur de S = S°. Pour obtenir $S^{\circ}_{20,w}$, on multiplie S° par 1,01, coefficient de viscosité du tampon utilisé.

c) Résultats :

Hp de Lapin :

Les valeurs de S calculées sont :

— pour une concentration de 5 mg/ml = 3,48-3,53 ;
— » 10 mg/ml = 3,40 ;
— » 15 mg/ml = 3,22.

A dilution infinie, on a : $S°_{20,w} = 4{,}0\text{-}4{,}1$.

Hp de Rat :

Les valeurs de S calculées sont :

— pour une concentration de 5 mg/ml = 3,57 ;
— » 10 mg/ml = 3,40 ;
— » 15 mg/ml = 3,30.

A dilution infinie, on a $S°_{20,w} = 3{,}65$.

4) Détermination du poids moléculaire *

L'effet Tyndall n'est pas une propriété exclusive des solutions macromoléculaires. On sait, en effet, depuis longtemps que toute substance mise en solution diffuse la lumière et l'intensité de celle-ci dépend de la concentration du corps dissous et du volume de la molécule en solution : l'intensité diffusée sera d'autant plus forte que la molécule diffusante sera plus grosse.

C'est cette constatation qui a conduit Putzeys et Brosteaux [70] à établir une formule permettant de déterminer le poids moléculaire d'une protéine à partir de l'intensité lumineuse diffusée par cette même protéine en solution.

Ces auteurs ont basé leur théorie sur celle de Rayleigh concernant la diffusion dans les gaz. Ceci restreint tout de suite le domaine d'application de la théorie de la diffusion aux protéines en solution.

En effet, idéalement, les molécules devraient se réduire à des points ; pratiquement, il ne faut pas que le diamètre de la molécule dépasse le vingtième de la longueur d'onde de la lumière incidente. D'autre part, la relation de Rayleigh ne vaut rigoureusement que pour des solutions infiniment diluées où les interactions entre molécules sont pratiquement nulles.

(*) Nous remercions vivement Monsieur le Professeur Putzeys qui nous a permis de faire des mesures de diffusion de la lumière dans son laboratoire et nous a aidés de ses précieux conseils.

La formule déduite par PUTZEYS s'écrit :

$$M' = \frac{1}{K} \cdot \frac{\left(\frac{i_p}{i_c} \cdot \psi - \Delta\right)\frac{1}{g}}{n^2_1 \left[\frac{n^2_2 - n^2_1}{n^2_2 + 2\,n^2_1}\right]^2 \varphi^2}$$

M' est le poids moléculaire apparent (fonction de la concentration), tandis que M est le poids moléculaire vrai à dilution infinie.

K est la constante d'étalonnage du cube de verre de référence, constante établie à l'aide de l'amandine (M = 330.000)

$$K = 3.476 \cdot 10^{-2} \text{ pour } \lambda = 535 \text{ m}\mu$$

$\frac{i_p}{i_c}$ est le rapport de l'intensité diffusée par la solution de protéine à l'intensité diffusée par le cube de référence.

ψ est le facteur de correction dû à l'absorption de la solution.

Δ est un facteur de correction relatif à la diffusion propre du solvant.

g : mg de protéine par millilitre.

n_1 et n_2 : respectivement l'indice de réfraction du solvant et de la protéine ; $n_2 = 1{,}604$.

φ : volume spécifique partiel de la protéine ; $\varphi = 0{,}736$.

La méthode suivie ici consiste donc non pas à faire des mesures absolues, mais à comparer l'intensité diffusée par la solution de protéine (ici Hp) à celle diffusée par un cube de verre opalescent, lui-même précédemment étalonné par une protéine de référence de poids moléculaire connu : la globuline des amandes douces (*Prunus amygdalus* L.) ou amandine (M = 330.000).

En ce qui concerne les facteurs de correction, nous n'avons retenu que celui dû à la diffusion du solvant.

Comme nous l'avons déjà dit, le poids moléculaire calculé au moyen de cette formule pour une certaine concentration n'est qu'un poids moléculaire apparent. Pour obtenir un poids moléculaire vrai, on extrapole les valeurs de M' à dilution infinie. L'extrapolation dans la plupart des cas se fait graphiquement : on porte en ordonnées les valeurs de 1/KM' et en abscisses les différentes concentrations.

Il est très important de débarrasser la solution d'agrégats qui auraient pu se former au cours de la préparation et dont la présence a comme conséquence de perturber complètement les mesures de diffusion. En effet, le poids moléculaire obtenu par la diffusion est un poids moléculaire moyen d'après la masse et non d'après le nombre de molécules, comme c'est le cas pour la pression osmotique. De ce fait, il est beaucoup plus sensible à la présence de grosses molécules. Il s'impose donc de faire subir à la solution-mère une ultracentrifugation prolongée.

Technique expérimentale :

Les solutions-mères de Hp de Rat et de Lapin sont dialysées pendant 40 heures contre du tampon 0,1 M en acétate de Na et 0,1 M en NaCl à pH 5,1. Elles sont ensuite centrifugées à l'ultracentrifugeuse préparative Martin-Christ à 60.000 tours/mn pendant une heure.

Nous avons déterminé la concentration des solutions les plus diluées par leur absorbance à 280 mμ.

Nous avons choisi pour φ (vol. spéc. partiel) la valeur calculée pour Hp I humaine, c'est-à-dire 0,736, et comme indice de réfraction de la protéine la valeur 1,604. Celui du solvant est déterminé au moyen du réfractomètre de Pulfrich : 1,3368.

Avec le tampon utilisé, $\Delta = 0{,}002910$.

Tableau II

Détermination de i_p/i_c, *de* $\frac{1}{K'M'} \cdot 10^4$ *en fonction de g*

	g	$i_p/i_c - \Delta$	$\frac{1}{K'M'} \cdot 10^4$
Lapin	2,510	0,09644	26,026
	0,8283	0,03769	21,976
	0,6287	0,02862	21,974
	0,3132	0,013536	23,148
	1,231	0,05453	22,574
Rat	3,644	0,11966	30,452
	1,822	0,06620	27,522
	1,3526	0,04829	28,009
	0,9111	0,03291	27,68
	0,3709	0,01417	26,175

Les résultats expérimentaux sont consignés dans le *Tableau II*.

Les valeurs de $\frac{1}{K'M'} \cdot 10^4$ extrapolées à dilution infinie (*fig. 8*) sont égales à :

— 21,0 pour Hp de Lapin ;
— 26,0 pour Hp de Rat.

La formule de PUTZEYS peut être mise sous la forme :

$$\frac{1}{K' M'} = \frac{g}{\frac{i_p}{i_c} \psi - \Delta}$$

où :

K' est le produit des deux constantes K . K''
K = constante de l'appareil

$$K'' = n^2_1 \left[\frac{n^2_2 - n^2_1}{n^2_2 + 2\, n^2_1} \right]^2 \varphi^2$$

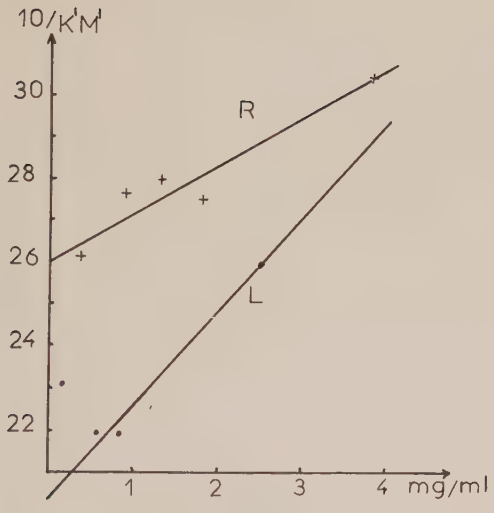

FIG. 8 : Détermination du poids moléculaire des haptoglobines de Lapin et de Rat.

Valeur de $\frac{1}{K'M'}$ à dilution infinie

En introduisant dans cette formule la valeur de $\frac{1}{K' M'} \cdot 10^4$ extrapolée à dilution infinie, on obtient le poids moléculaire vrai (M).

Pour le Lapin, on a :
— M = 74.210, soit 74.000 ± 7.000.

Pour le Rat, on a :
— M = 59.997, soit 60.000 ± 6.000.

Par ultracentrifugation analytique, la méthode d'Archibald a donné, pour Hp de Lapin, un poids moléculaire de 70.000 (± 7.000).

5) Précipitation par le sulfate d'ammonium

a) Mode opératoire :

Dans une série de tubes à essais identiques, on dépose 1 ml de solution de Hp (2 à 3 mg). Puis on ajoute du sulfate d'ammonium saturé ajusté à pH 7, et de l'eau bidistillée de façon à obtenir une série de solutions de même volume dont les teneurs en sulfate d'ammonium soient 30, 34, 38, 40 ... 48, 50, 52, 54, 56 %. On bouche. On laisse sédimenter 6 heures. On centrifuge. On sépare le surnageant.

On dissout le précipité dans 2,5 ml de tampon phosphate 0,15 M pH 7 et on mesure les absorbances dues au précipité et au filtrat à 280 mμ.

b) Résultats (*fig. 9*) :

Hp de Rat :

La zone de précipitation par le sulfate d'ammonium à pH 7 se trouve comprise entre 40 et 60 % de saturation.

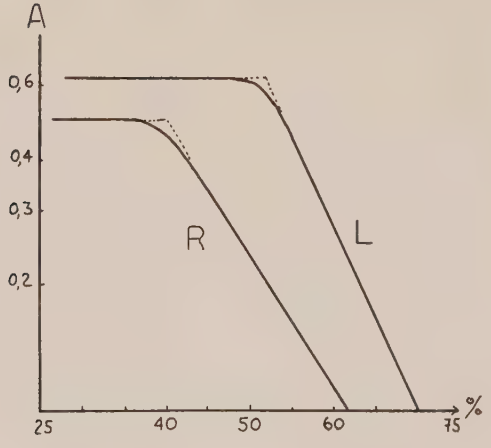

Fig. 9 : Zones de précipitation par le sulfate d'ammonium à pH 7 des haptoglobines de Lapin et de Rat. En abscisses : p. 100 de saturation. En ordonnées : Log de l'absorbance du surnageant à 280 mμ

Hp de Lapin :

La zone de précipitation de Hp de Lapin par le sulfate d'ammonium à pH 7 est comprise entre 56 et 70 % de saturation.

6) Composition du complexe

Le principe du dosage de Hp repose sur l'activité peroxydasique du complexe Hp-Hb. Il est donc indispensable de savoir dans quelle proportion molaire les deux protéines s'unissent. C'est cette composition du complexe en Hp et en Hb que nous allons maintenant établir.

a) Méthode d'isolement du complexe :

Nous avons utilisé la méthode de Moretti-Dobryszycka [27]. Celle-ci repose sur le fait que le complexe Hp-Hb est élué d'une colonne de DEAE-cellulose par un tampon de molarité inférieure à celle du tampon nécessaire pour éluer Hp. Elle consiste à fixer Hp sérique sur une colonne de DEAE-cellulose et, après lavage de la colonne, à éluer spécifiquement le complexe Hb-Hp avec une solution de Hb. Pour obtenir un complexe pur, il faut que le lavage de la colonne et l'élution du complexe soient effectués avec des tampons de molarités très voisines.

La pureté du complexe ainsi formé est vérifiée par électrophorèse en gel d'amidon ; après révélation par la benzidine et par l'amido-schwarz, il ne doit présenter qu'une seule et même bande.

On opère de la façon suivante : 1 ml de sérum de Lapin ou de Rat est dilué 5 fois avec du tampon acétate 0,03 M à pH 5,1 et versé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec le même tampon. On lave la colonne avec du tampon acétate de pH 5,1 et de molarité 0,06 M pour Hp de Rat et 0,08 M pour Hp de Lapin.

On calcule la quantité de Hb de cheval M/2.000 suffisante pour saturer la quantité de Hp versée sur la colonne. Cette quantité de Hb est diluée dans 1 ml de tampon 0,08 M pour Hp de Lapin et 0,07 M pour Hp de Rat. On laisse la solution de Hb s'infiltrer dans la partie supérieure de la colonne et on poursuit ensuite l'élution du complexe ainsi formé avec le tampon qui a servi à la dilution de Hb. Le complexe coloré est recueilli dans deux fractions de 2 ml chacune. La première de ces fractions contient le complexe à l'état pur.

On peut également partir d'une préparation de Hp pure pour étudier la nature du complexe. Dans ce cas, la chromatographie sur DEAE-cellulose reste nécessaire pour séparer le complexe de la fraction de Hp dénaturée (c'est-à-dire celle qui ne se combine plus à Hb). Celle-ci reste fixée sur la colonne après l'élution du complexe par un tampon de faible molarité.

Au cours de ces expériences, nous avons utilisé la cyanméthémoglobine, plus stable et dont le spectre d'absorption a été parfaitement établi. Les absorptions spécifiques sont :

— à 280 mμ : 2,09 pour 1 mg/ml ;

— à 540 mμ : 0,646 pour 1 mg/ml.

b) Détermination de la composition moléculaire du complexe Hb-Hp :

On mesure l'absorbance de la solution de complexe ainsi obtenue à deux longueurs d'onde. A 540 mμ, seule la cyanméthémoglobine absorbe. On peut donc en déduire la quantité de Hb contenue dans le complexe. D'autre part, à 280 mμ, on mesure l'absorbance globale due aux deux protéines présentes, Hp et Hb.

Puisqu'on connaît la concentration C en Hb par la première mesure faite à 540 mμ, on peut en déduire celle de Hp.

Un calcul simple nous a permis, sur la base du rapport des absorbances mesurées à 540 et 280 mμ, de vérifier que le complexe Hp-Hb dans le cas du Rat et du Lapin était bien équimoléculaire.

En effet, soit A l'absorbance d'une solution de complexe mesurée à 540 mμ, et soit B l'absorbance à 280 mμ. On a A = 0,646 C, C étant la concentration de Hb exprimée en mg/ml de solution.

Pour Hp de Lapin, ε = 1,16 à 280 mμ. Si nous supposons *a priori* que la composition du complexe est équimoléculaire, la relation suivante doit se vérifier :

$$B = 1{,}16 \times \frac{70}{66} C + 2{,}09\ C = 3{,}32\ C$$

et le rapport $\frac{B}{A}$ doit avoir la valeur :

$$\frac{B}{A} = \frac{3{,}32}{0{,}646} = 5{,}15$$

Expérimentalement, on obtient pour $\frac{B}{A}$ la valeur de 4,85 (moyenne de 3 expériences).

De même, pour le Rat on doit avoir :

$$B = 1{,}18 \times \frac{60}{66} C + 2{,}09\ C = 3{,}16\ C$$

$$\frac{B}{A} = \frac{3{,}16}{0{,}646} = 4{,}9$$

La moyenne des mesures donne une valeur de 4,7 (moyenne de 3 expériences).

Les rapports des absorbances à 540 et à 280 mμ sont donc vérifiés à 5 % près. Etant donné que les poids moléculaires ne sont connus qu'avec une approximation de 10 %, on ne peut espérer atteindre une plus grande précision.

En conclusion, on peut affirmer que les Hp de Lapin et de Rat s'unissent molécule à molécule avec Hb comme Hp 1-1 humaine.

7) Activité et pureté

Les résultats du paragraphe précédent nous permettent de déterminer dans quelle mesure une préparation pure de Hp est en même temps active.

En effet, la méthode de dosage de JAYLE, nous l'avons vu, consiste à déterminer le volume V de la solution à titrer qui sature exactement l'hémoglobine contenue dans 0,1 ml de Hb de cheval M/80.000. Or, nous venons de le démontrer, dans ce volume V, chaque molécule de Hp s'unit à une molécule de Hb. Comme le volume V sature exactement 0,1 ml de Hb, il contient exactement le même nombre de molécules que 0,1 ml de Hb dont nous connaissons la concentration molaire. D'où il en résulte que la concentration molaire de Hp dans la solution à doser est $\frac{0,1}{V}$ fois celle de la solution de Hb. Ceci se traduit par :

$$C_{Hp} = \frac{0,1}{V} \cdot C_{Hb}$$

C_{Hp} = Concentration molaire en Hp de la solution à doser.
C_{Hb} = Concentration molaire de la solution de Hb.

Connaissant la concentration molaire de Hb et le poids moléculaire de Hp, on en déduit la concentration pondérale en g/l de la solution de Hp :

$$c = \frac{0,1}{V} \cdot \frac{M}{80.000}$$

M = Poids moléculaire de Hp.
c = Concentration en g/l de Hp.
$\frac{0,1}{V}$ = i = indice de Hp.

Cette formule permet de passer de l'indice de Hp connu par la méthode de JAYLE à la concentration pondérale d'une solution de Hp.

La comparaison des résultats obtenus par deux méthodes différentes de dosage nous permet de savoir si une protéine estimée pure en gel d'amidon est en même temps active. En effet, l'absorbance de la solution à 280 mμ permet de calculer la concentration de la protéine totale, active ou inactive, présente dans la solution. Par contre, la méthode de JAYLE permet de doser la fraction seulement active de cette protéine.

La concentration c en Hp de la solution à doser est donnée par la mesure d'absorbance faite à 280 mμ. On a :

$$c = \frac{A}{\varepsilon}$$

c = concentration de Hp en g/l.
A = absorbance de la solution à doser à 280 mμ.
ε = coefficient d'absorbance de Hp de Rat ou de Lapin.

D'autre part, une concentration c' en Hp active de la solution est donnée par son activité peroxydasique. On a :

$$c' = \frac{0{,}1}{V} \cdot \frac{M}{80.000}$$

Si les deux concentrations c et c' sont égales, on peut affirmer que la préparation de Hp est pure et active.

On peut même déterminer dans quelle mesure une préparation de Hp a gardé son activité peroxydasique. A cet effet, nous avons défini le taux d'activité. Il est égal au rapport c/c'. Il exprime en pour cent le poids de Hp active rapporté au poids de Hp total contenu dans la préparation :

$$\text{Taux d'activité} = \frac{i \cdot M \cdot \varepsilon}{A \cdot 80.000}, \text{ avec :}$$

pour le Lapin $\begin{cases} M = 70.000 \\ \varepsilon = 1{,}16 \end{cases}$

pour le Rat $\begin{cases} M = 60.000 \\ \varepsilon = 1{,}20 \end{cases}$

8) Application au dosage de Hp

L'emploi de la méthode de JAYLE pour doser les Hp de Lapin et de Rat et l'expression des résultats en g/l supposent connus le poids moléculaire des Hp, la composition de leur complexe avec Hb, et un troisième fait qu'il nous reste à établir. Les Hp animales jouent-elles, vis-à-vis de Hb, le même rôle activateur que Hp humaine ?

Pour le savoir, nous avons saturé trois prises de 0,1 ml de Hb de cheval M/80.000 séparément par des solutions de Hp humaine, Hp de Lapin et Hp de Rat. Dans les trois cas, la quantité d'iode libérée en 5 minutes est la même.

On peut donc utiliser la méthode de JAYLE pour doser les Hp animales.

CHAPITRE III

CONSTITUTION CHIMIQUE DES HAPTOGLOBINES DE LAPIN ET DE RAT

Dans cette deuxième partie, nous étudierons successivement la fraction protéique et la fraction glucidique des Hp de Lapin et de Rat.

I. — ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE

A. — TENEUR EN AZOTE

L'azote a été dosé par la microméthode de Kjehldahl.

Résultats :

Espèce	*N en %*
— Hp Lapin	12,3
— Hp Rat	14,6

B. — TENEUR EN PROTÉINE

La partie protéique des Hp de Lapin et de Rat a été déterminée par la méthode du biuret.

L'albumine humaine cristallisée a été choisie comme étalon.

Résultats :

Espèce	*Taux de protéine*
— Hp Lapin	80,6 %
— Hp Rat	85 %

C. — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS *

1) Technique

Nous avons utilisé l'auto-analyseur Technicon selon la méthode de Piez et Morris [68] modifiée par Dautrevaux [24]. Quatre prises d'essai de 5,00 mg de chacune des Hp sont hydrolysées pendant 24 heures pour les échantillons n^{os} 1 et 2, pendant 73 heures pour les échantillons n^{os} 3 et 4, par 10 ml HCl 5,6 N à 106°C.

Après hydrolyse, le contenu de chaque tube est recueilli, dilué avec 200 ml d'eau distillée, puis lyophilisé. Le résidu sec est repris par 2 ml de solution de Norleucine 1 mM ; une partie aliquote est soumise au dosage chromatographique. L'échantillon n° 3 est divisé en deux parties égales ; chacune est analysée séparément à titre de contrôle.

Les résultats sont rapportés à une valeur commune de 100 g de Hp qui correspond à 40 millimoles de Norleucine.

La teneur exacte des échantillons en Hp est calculée par mesure de l'absorbance.

Pour chaque Hp, la composition en acides aminés a été établie en faisant la moyenne des valeurs obtenues à chaque dosage. Les valeurs aberrantes n'ont pas été retenues. Pour la sérine, la thréonine, la méthionine, acides aminés partiellement détruits lors de l'hydrolyse, nous avons calculé leur taux par extrapolation au temps 0 des valeurs obtenues après 24 et 73 heures d'hydrolyse. Nous avons appliqué la formule suivante :

$$A_0 = A_1 \frac{t_2}{t_2 - t_1} - A_2 \frac{t_1}{t_2 - t_1} \qquad (1)$$

formule dans laquelle A_1 et A_2 sont les quantités de l'acide aminé étudié libérées au bout des temps d'hydrolyse t_1 et t_2. Si l'on porte ces valeurs en fonction du temps sur un graphique, les relations entre triangles semblables permettent d'établir l'équation (1) dans laquelle A_0 représente la teneur de la solution initiale en cet acide aminé. Cette valeur A_0 est obtenue par extrapolation au temps zéro de la droite déterminée par A_1 et A_2.

Pour le calcul du taux de la valine et de l'isoleucine, dont la libération par hydrolyse est lente, nous n'avons tenu compte que des valeurs obtenues après 73 heures d'hydrolyse.

(*) L'analyse quantitative des acides aminés a été faite par M. Dautrevaux que nous remercions vivement.

Le dosage du tryptophanne a été effectué selon la méthode de Spies et Chambers [80].

2) Résultats

Les *Tableaux I* et *II* donnent les résultats obtenus exprimés en grammes de résidus pour 100 g de Hp de Lapin (*Tableau I*) et de Rat (*Tableau II*).

A titre de comparaison, nous donnons dans le *Tableau III* la composition en acides aminés de Hp 1-1 humaine.

De l'examen de ce tableau récapitulatif, il résulte que :

1° Les 3 Hp n'ont pas la même composition en acides aminés. En particulier, Hp de Rat se différencie nettement des deux autres.

2° Pour Hp de Rat, outre les acides aminés basiques ou acides, ce sont surtout les acides aminés à groupements polaires qui accusent les plus fortes différences : thréonine, sérine, cystine, méthionine. Or, on sait que de tels acides aminés interviennent dans l'édification de la structure tertiaire de la protéine. On peut donc s'attendre à ce que la protéine du Rat ait une structure plus ramassée que celles de Hp du Lapin ou de l'Homme.

Tableau I : *Composition de l'haptoglobine de Lapin*
(Composition exprimée en grammes de résidus pour 100 g de Hp)

N°	*Hydrolyse de 24 h*		*Hydrolyse de 73 h*			*Moyenne*
	1	2	3	3	4	
Acide aspartique ..	7,87	—	8,26	8,63	8,53	8,3
Thréonine	4,40	4,43	4,45	4,49	4,15	4,4*
Sérine	4,49	4,15	3,74	3,61	3,70	4,6*
Acide glutamique ..	9,95	10,80	10,50	9,59	9,68	10,1
Proline	2,99	3,70	3,56	2,78	—	3,3
Glycine	2,35	2,60	2,40	2,30	2,24	2,4
Alanine	4,08	3,60	3,61	3,67	3,49	3,7
Cystéine	1,78	1,64	1,55	1,67	1,60	1,6
Valine	4,06	4,29	5,04	—	5,16	5,1**
Méthionine	1,07	0,93	0,71	0,69	0,69	1,1*
Isoleucine	2,62	2,88	3,17	3,36	3,70	3,4**
Leucine	6,28	6,21	6,51	6,64	6,39	6,4
Tyrosine	6,00	5,80	6,53	6,11	5,89	5,9
Phénylalanine	3,83	3,67	3,95	3,67	3,63	3,7
Lysine	6,44	6,35	6,07	6,66	—	6,4
Histidine	2,71	2,90	3,17	3,03	3,17	3,0
Arginine	—	3,68	4,22	3,29	3,67	3,7
Tryptophanne	—	—	—	—	—	2,2

* Acides aminés détruits par l'hydrolyse ; valeurs extrapolées.
** Acides aminés difficilement libérés à l'hydrolyse. On ne tient compte que des hydrolyses de 73 heures.

TABLEAU II : *Composition de l'haptoglobine de Rat*
(Composition exprimée en grammes de résidus pour 100 g de Hp)

N°	*Hydrolyse de 24 h*		*Hydrolyse de 73 h*			*Moyenne*
	1	2	3	3	4	
Acide aspartique ..	8,32	7,57	8,19	8,22	8,24	8,1
Thréonine	5,06	5,28	4,81	4,73	4,57	5,4*
Sérine	4,22	4,47	3,66	3,66	3,56	4,7*
Acide glutamique ..	12,04	11,62	11,39	11,36	11,28	11,5
Proline	4,22	3,94	4,27	4,21	4,65	4,3
Glycine	2,88	2,94	2,82	2,90	2,82	2,9
Alanine	4,07	4,10	4,13	4,07	4,10	4,1
Cystéine	1,92	1,98	2,10	1,72	2,22	2,0
Valine	4,41	4,33	5,35	5,27	5,32	5,3**
Méthionine	1,68	1,65	1,29	1,30	1,26	1,8*
Isoleucine	2,70	2,61	3,32	3,23	3,18	3,2**
Leucine	6,47	6,20	6,49	6,58	6,50	6,4
Tyrosine	4,58	4,73	4,76	4,90	4,58	4,7
Phénylalanine	3,64	3,73	3,66	3,34	3,43	3,6
Lysine	8,13	7,96	8,38	8,28	8,35	8,2
Histidine	2,48	2,87	2,76	2,93	2,82	2,8
Arginine	3,92	—	4,05	3,97	4,09	4,0
Tryptophanne	—	—	—	—	—	3,0

* Acides aminés détruits par l'hydrolyse ; valeurs extrapolées.
** Acides aminés difficilement libérés à l'hydrolyse. On ne tient compte que des hydrolyses de 73 heures.

TABLEAU III : *Composition des haptoglobines de Lapin et de Rat, comparée à celle de l'haptoglobine humaine Hp 1-1*
(Composition exprimée en grammes de résidus pour 100 g de Hp)

	Lapin	*Rat*	*Homme*
Acide aspartique	8,3	8,1	9,3
Thréonine	4,4	5,4	4,4
Sérine	4,6	4,7	3,4
Acide glutamique	10,1	11,5	9,9
Proline	3,3	4,3	4,0
Glycine	2,4	2,9	2,6
Alanine	3,7	4,1	3,4
Demi-cystine	1,6	2,0	2,1
Valine	5,1	5,3	6,2
Méthionine	1,1	1,8	1,0
Isoleucine	3,4	3,2	3,3
Leucine	6,4	6,4	6,3
Tyrosine	5,9	4,7	4,9
Phénylalanine	3,7	3,6	2,6
Lysine	6,4	8,2	8,2
Histidine	3,0	2,8	3,0
Arginine	3,7	4,0	2,3
Tryptophanne	2,2	3,0	3,0
Acide N-acétyl-neuraminique	5,4	4,1	5,3
Galactose et mannose	6,6	4,7	7,79
Glucosamine	5,6	4,6	5,3
Fucose	0,3	0,4	0,2
Total :	97,2	99,8	98,5

II. — ETUDE DES GLUCIDES

A. — ANALYSE QUALITATIVE

a) Méthode :

Elle consiste en une hydrolyse chlorhydrique suivie d'une chromatographie sur résine cationique et enfin d'une chromatographie sur papier. Une fois les glucides et acides aminés libérés par hydrolyse, l'hydrolysat est dilué et passé sur une colonne de résine Amberlite IRC 120 (H^+). Les acides aminés sont retenus sélectivement par la résine tandis que les glucides, y compris la glucosamine, passent librement dans l'effluent sans être fixés.

L'hydrolyse est effectuée par HCl N sur des quantités de Hp de Rat et de Lapin de l'ordre du mg et dans des tubes rodés placés à l'étuve pendant 6 heures à 100°. La solution obtenue après hydrolyse est diluée pour obtenir une concentration 0,3 N en HCl. La colonne de résine est équilibrée contre HCl 0,3 N.

100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N suffisent à éluer les glucides. Les eaux de lavage et l'effluent sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif et repris par 50 μl d'eau bidistillée. On en prélève deux fois 20 μl que l'on dépose au bas d'une feuille de papier à chromatographie. En même temps sont déposés en quantités égales des témoins de galactose, mannose, fucose, glucosamine. Après une migration de 20 heures dans la phase butanol - pyridine - HCl 0,1 N (50 : 30 : 20), on révèle le chromatogramme par l'oxalate d'aniline.

Pour caractériser la présence d'acide sialique, on hydrolyse 3 mg de Hp en présence de HCl 0,01 N pendant une heure à 80°. On dialyse l'hydrolysat pendant une nuit et on évapore à sec le dialysat. Le dépôt est repris par 0,1 ml d'eau que l'on dépose sur un papier à chromatographie Schleicher et Schüll n° 2.043 B. On utilise la même phase solvante que pour la chromatographie des hexoses. La révélation est faite par l'orcinol trichloracétique en présence de témoins.

b) Résultats :

Les hexoses de Hp de Lapin et de Rat libérés après hydrolyse sont : le galactose, le mannose, la glucosamine et le fucose. Ce sont les mêmes glucides qui entrent dans la composition des Hp humaines [17, 20, 36].

L'acide sialique présent a été identifié à l'acide N-acétyl-neuraminique.

B. — ANALYSE QUANTITATIVE *

1) Méthode

a) Hexoses : Galactose — Mannose

• Dosage global

Nous avons suivi la méthode de Sörensen et Haugaard [79] modifiée par Rimington [73]. Comme conditions d'hydrolyse, nous avons choisi celles que préconisent Schönenberg et coll. [76]. Nous avons, en effet, constaté d'une part qu'une hydrolyse faite à 80°C pendant 20 minutes, telle qu'elle est décrite dans la méthode classique, n'était pas suffisante puisqu'elle ne libérait pas tous les glucides. D'autre part, une hydrolyse à 100° pendant 15 minutes (méthode préconisée par L. Cloarec) [18] entraîne une destruction partielle des glucides et surtout confère aux absorbances des témoins protéines des valeurs trop élevées.

Appliquée au dosage des glucides de Hp 1-1 humaine, l'hydrolyse de 30 minutes à 80°C donne des résultats comparables à ceux que d'autres auteurs ont obtenus par d'autres méthodes sur la même protéine.

A 1 ml de la solution de glycoprotéine contenant environ 100 μg d'hexoses, on ajoute 1 ml d'eau bidistillée, 2 ml de la solution sulfurique d'orcinol à 2 % (2 g d'orcinol dissous dans 100 ml de H_2SO_4 à 20 % vol/vol) et ensuite 15 ml de H_2SO_4 à 60 %.

Tout le dosage est effectué dans des tubes rodés et bouchés afin d'éviter l'évaporation. Après agitation, on place les tubes dans un bain-marie maintenu à 80°C pendant 30 minutes en ayant soin de les couvrir d'un papier noir afin de les mettre à l'abri de la lumière.

Un blanc eau distillée, un témoin protéine et une solution standard contenant 20 à 150 μg d'un mélange (proportion 2 : 1) de galactose-mannose sont préparés en même temps et sont traités de la même manière. Après 30 minutes d'hydrolyse, les tubes sont retirés du bain-marie et refroidis dans un bain de glace pendant 10 minutes. On lit ensuite les absorbances à 420 mμ en utilisant comme témoin le blanc réactif. On peut ne pas tenir compte du témoin protéine si celui-ci présente une absorption négligeable.

(*) Au cours de cette analyse, nous avons tenu compte de l'étude importante faite par Montreuil et Spik [60] sur le microdosage des glucides.

Comme longueur d'onde, nous avons choisi 420 mμ et non 540 mμ, car en nous plaçant au maximum d'absorption, l'interférence des substances parasites telles que les substances aminées devient minimale.

La lecture à 540 mμ est conseillée par les auteurs lorsque les proportions de galactose-mannose ne sont pas connues. A 540 mμ, en effet, les différences entre les spectres d'absorption du galactose et du mannose sont minimes.

Le fucose donne avec le réactif à l'orcinol sulfurique un spectre d'absorption à peu près identique à celui des hexoses avec absorption maxima à 420 mμ. Comme le pourcentage de fucose est faible, il est permis de faire la correction en retranchant le pourcentage de fucose du total d'hexoses obtenu par la méthode à l'orcinol.

• Rapport galactose-mannose

Pour déterminer ce rapport, nous avons utilisé deux méthodes :

— La première qui consiste en une chromatographie quantitative sur papier après hydrolyse ménagée.

— La deuxième qui consiste à faire un dosage à l'orcinol sulfurique comprenant des lectures d'absorbance faites à deux longueurs d'onde différentes, selon le procédé de Mihalyi et Godfrey [59]. De la valeur du rapport des absorbances, on peut en déduire la proportion galactose-mannose contenue dans les Hp de Rat et de Lapin.

1) *Analyse chromatographique*

Elle consiste en une hydrolyse chlorhydrique (6 heures à 100°C), suivie d'un passage sur colonne de résine Amberlite IRC 120 (H^+) et enfin d'une chromatographie sur papier.

On hydrolyse environ 6 mg de protéine. L'hydrolysat est évaporé à sec et repris par de l'eau distillée. Cette opération est répétée 5 à 6 fois pour éliminer HCl. On reprend l'hydrolysat une dernière fois par 10 ml d'eau et cette solution est passée sur une colonne d'IRC 120 (H^+). Les acides aminés et la glucosamine sont fixés tandis que galactose, mannose, fucose passent dans l'effluent. Celui-ci est évaporé à sec et repris par 30 μl d'eau bidistillée. De cette solution, 10 μl sont déposés en double sur un papier à chromatographie. En même temps sont déposés quantitativement et en double un mélange équimoléculaire de galactose-mannose contenant 30 à 50 μg de chacun des hexoses. L'un sert de témoin pour le dosage tandis que l'autre, révélé à la ninhydrine, constitue l'indicateur-témoin des substances glucidiques : galactose et mannose.

Après migration dans la phase butanol-pyridine-HCl 0,1 N, les témoins sont révélés à l'oxalate d'aniline et les spots de Rf corres-

pondant au galactose et au mannose sont découpés, élués dans des tubes à essai contenant 3 ml d'eau bidistillée.

Des 3 ml de solution, 2 ml sont prélevés et dosés par la méthode à l'orcinol.

2) *Méthode de* Mihalyi *et* Godfrey [59]

Elle consiste en un dosage à l'orcinol comprenant des mesures d'absorbance faites à deux longueurs d'onde différentes, 475 et 516 mμ. L'hydrolyse de 30 minutes à 80°C en milieu H_2SO_4 ne peut être utilisée car elle supprime toute différence entre les rapports des absorbances faites aux différentes longueurs d'onde. Comme, d'autre part, l'hydrolyse de 15 minutes ne suffit pas pour libérer tout le galactose et tout le mannose, nous avons dû faire précéder le dosage d'une hydrolyse préalable. Celle-ci est effectuée en milieu acide sulfurique dilué (1,5 N) pendant 6 heures.

Les solutions standard sont composées de trois mélanges différents de galactose et mannose. Le premier comprend deux fois plus de galactose que de mannose. Le second est un mélange équimoléculaire des deux hexoses et le troisième comprend deux fois plus de mannose que de galactose.

Le rapport des absorbances mesurées à 475 mμ et à 516 mμ augmente proportionnellement à la quantité de mannose présente dans le mélange.

b) Osamines :

Pour le dosage, nous avons suivi la méthode d'Elson et Morgan modifiée par Blix [9] telle que Winzler l'a décrite [89]. Elle consiste à doser la glucosamine libérée par une hydrolyse chlorhydrique. Celle-ci réagit en milieu alcalin avec le réactif d'Ehrlich au p. amino-diméthylamino-benzaldéhyde pour donner un composé de coloration violette.

• Hydrolyse

L'hydrolyse doit répondre à deux conditions ; d'une part, elle doit être complète et d'autre part être suffisamment douce pour empêcher la dégradation des substances libérées.

Les conditions optima sont réalisées dans le cas présent lorsque l'hydrolyse est faite en milieu HCl de faible molarité (1,5 N) et pendant une durée de 12 heures.

• Réactifs

— *Solution d'acétylacétone :* 1 ml d'acétylacétone est ajouté à 50 ml de Na_2CO_3 0,5 M.

— *Réactif d'Ehrlich :* 80 mg de paradiméthylaminobenzaldéhyde sont dissous dans 300 ml de méthanol et 30 ml de H_2SO_4 concentré.

• Développement de la coloration

Dans des tubes à essai rodés, on introduit 1 ml de l'hydrolysat neutralisé par la soude N (par une touche sur papier indicateur, on vérifie que le pH est voisin de 7). La prise contient 30 à 40 μg de glucosamine. On y ajoute 1 ml du réactif à l'acétylacétone. Après agitation, on place les tubes bouchés dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes. On les refroidit ensuite sous eau courante et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu ainsi que 1 ml du réactif d'Ehrlich.

On ajoute 2 ml d'alcool éthylique. Les tubes sont agités et laissés dans l'obscurité pendant 24 heures. Une coloration rose se développe. En même temps, on prépare un témoin protéine, un « blanc » et une gamme de référence comprise entre 20 à 100 μg de glucosamine. On fait les lectures à 5.150 A°. Selon Schloss [75], c'est le maximum d'absorption du produit de condensation entre le 2 méthylpyrrole et le réactif d'Ehrlich.

c) Dosage du fucose :

Dische et Shettles [26] sont les premiers à avoir utilisé la cystéine en milieu chlorhydrique pour le dosage des méthylpentoses. Nous avons suivi leur technique.

Les hexoses et les méthylpentoses donnent avec le chlorhydrate de cystéine en milieu chlorhydrique concentré une coloration jaunâtre. Elle est due à la condensation de la cystéine avec le dérivé furfuralique produit par l'action de l'acide sulfurique sur les oses. Vraisemblablement, c'est par la fonction thiol de la cystéine que se forme le produit de condensation.

Pour doser de manière spécifique les méthylpentoses, on met à profit deux propriétés caractéristiques qui différencient les méthylpentoses des hexoses. On sait en effet que le méthylfurfural provenant des méthylpentoses est plus stable que l'hydroxyméthylfurfural dérivé des hexoses.

On porte le temps de chauffe à 10 minutes au lieu de 5 minutes tel qu'il est prescrit pour le dosage des hexoses. En outre, on sait que les spectres d'absorption entre les deux classes de glucides sont aussi différents. Pour les hexoses, le maximum d'absorption se situe à 4.150 A°, tandis qu'il est à 4.000 A° pour le fucose. On se place à 3.690 A° pour la lecture des absorbances.

Pour évaluer l'interférence des hexoses à cette longueur d'onde, on fait une seconde lecture à 4.270 A°, longueur d'onde symétrique

de 3.690 A° par rapport au maximum d'absorption des hexoses, mais à laquelle l'absorbance du fucose est pratiquement nulle. On peut, par différence, déterminer l'absorbance propre du fucose à 3.690 A° :

$$\text{Absorbance (A) du fucose} = A_{3960} - A_{4270}$$

En pratique, il faut aussi tenir compte de la coloration due à la protéine elle-même et à ses produits d'hydrolyse. A cet effet, nous avons remplacé le standard habituel composé de fucose pur par un « témoin interne ». Celui-ci est composé d'un ml de la solution de protéine auquel on a ajouté 20 μg de fucose.

On a la relation suivante :

$$\frac{20\ (A_{x\ 396} - A_{y\ 427}) - (A_{to\ 396} - A_{to\ 427})}{(A_{t\ 396} - A_{t\ 427}) - (A_{to\ 396} - A_{to\ 427})} = x\ \mu g \text{ fucose}$$

A_t = absorbance du « témoin interne ».

A_{to} = absorbance du témoin protéine.

A_x et A_y sont respectivement les absorbances de la solution à doser à 396 et à 427 mμ.

- Réactifs

— *Solution d'acide sulfurique :*

— H_2SO_4	6 vol.
— Eau bidistillée	1 vol.

— *Solution de chlorhydrate de cystéine :*

— Chlorhydrate de cystéine	3 g
— Eau bidistillée q.s.p.	100 ml

- Développement de la coloration

A 1 ml de la solution de glycoprotéine contenant 20 μg de 6-désoxy-hexose, on ajoute 4,5 ml de la solution d'acide sulfurique en refroidissant les tubes rodés dans un bain d'eau froide et de glace. Les tubes sont agités, hermétiquement bouchés, et sont réchauffés jusqu'à atteindre la température de la pièce (20 à 22°C). Les tubes sont ensuite plongés dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Après refroidissement sous eau courante, on y ajoute 0,1 ml de la solution de chlorhydrate de cystéine.

Les tubes sont ensuite agités énergiquement et laissés à l'obscurité et à température ambiante pendant quatre heures. Il se développe une coloration jaune-verdâtre.

Les lectures sont faites à 396 et 427 mμ.

En même temps sont préparés deux témoins protéines, l'un exempt de fucose et l'autre exempt de chlorhydrate de cystéine mais auquel on aura ajouté 0,1 ml d'eau bidistillée.

d) Dosage de l'acide sialique :

Pour déterminer le taux d'acide sialique, nous avons utilisé deux méthodes différentes :

1) la méthode à la diphénylamine,

2) la méthode à l'acide thiobarbiturique.

1) *Dosage des acides sialiques totaux : Méthode à la diphénylamine*

Cette méthode, décrite pour la première fois en 1930 par Dische [25], a été appliquée par Werner et Odin [88] au dosage des acides sialiques totaux contenus dans les glycoprotéines.

L'acide sialique sous l'action des acides est rapidement désacétylé et transformé en un produit de dégradation qui donne avec la diphénylamine un produit de condensation coloré.

Pour le mode opératoire, nous avons suivi la technique décrite par Winzler [89].

• Réactifs

— *Solution d'acide trichloracétique :*

— à 7,5 g p. 100 ml ;

— à 15 g p. 100 ml.

— *Réactif à la diphénylamine :* on dissout 5 g de diphénylamine dans un mélange de 450 ml d'acide acétique et 50 ml d'acide sulfurique.

— *Solution témoin d'acide sialique :* à défaut d'acide sialique pur, nous avons utilisé comme témoin une α_2-glycoprotéine extraite du sérum de cheval * et contenant un taux connu d'acide sialique : 10,4 %. Trois tubes témoins contenant de 100 à 200 μg de cette protéine constituent la gamme de référence.

• Méthode

Dans des tubes rodés, on introduit :

— soit 1 ml de solution contenant 100 à 200 μg d'acide sialique et 2 ml d'acide trichloracétique à 7,5 % ;

— soit 2 ml de solution contenant 100 à 200 μg d'acide sialique et 1 ml d'acide trichloracétique à 15 %.

Aux 3 ml ainsi obtenus, on ajoute 6 ml du réactif à la diphénylamine. Les tubes sont agités et ensuite placés dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Les tubes sont ensuite refroidis et maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes.

Les mesures d'absorbance sont effectuées à 530 mμ.

(*) Aimablement donnée par R. Got que nous remercions.

2) *Dosage des acides sialiques libres : Méthode de* Warren [87]

Les acides sialiques se trouvant en position externe dans les glycoprotéines, il est facile de les libérer par hydrolyse et ensuite de les doser.

- Principe

Le produit d'oxydation de l'acide sialique formé sous l'action de l'acide periodique, l'acide β-formylpyruvique se combine avec l'acide thiobarbiturique pour donner un produit de condensation de coloration rose. La solution colorée est ensuite extraite par le cyclohexanone.

- Hydrolyse

L'hydrolyse est effectuée en milieu HCl 0,01 N à 100° pendant une heure et demie sur des quantités de Hp de l'ordre du mg.

- Réactifs

— Solution de métapériodate de sodium 0,2 M dans l'acide phosphorique 9 M.

— Solution d'arsénite de sodium à 10 % dans une solution 0,5 M de sulfate de sodium dans l'acide sulfurique 0,1 N.

— Solution d'acide thiobarbiturique 0,6 % dans une solution de sulfate de sodium 0,5 M.

— Cyclohexanone.

- Méthode

Dans des tubes à essai est introduit 0,2 ml d'une solution contenant environ 0,05 μmole d'acide N-acétyl-neuraminique. On y ajoute 0,1 ml de la solution de périodate.

Les tubes sont agités et laissés au repos pendant 20 minutes à la température de la chambre. On y ajoute alors 1 ml de la solution d'arsénite et les tubes sont agités jusqu'à ce qu'une coloration brunâtre disparaisse.

On ajoute ensuite 3 ml d'acide thiobarbiturique ; après agitation, les tubes sont obturés avec des billes de verre et ensuite plongés pendant 15 minutes dans un bain-marie bouillant. Ils sont ensuite refroidis pendant 15 minutes dans l'eau froide et la substance colorée est extraite par 3 ml de cyclohexanone.

La séparation de la phase organique de la phase aqueuse se fait par centrifugation (durée : 3 minutes).

Les mesures d'absorbance sont effectuées à 549 mμ.

Le coefficient d'absorbance de l'acide N-acétylneuraminique est égal à 57.

L'équation suivante permet de calculer le taux d'acide sialique :

$$\text{Nombre de } \mu\text{-moles d'acide sialique} = \frac{V \times A_{549}}{57}$$

V = volume final de la solution à doser avant extraction par le cyclohexanone.
A = absorbance de la solution à 549 mμ.

2) Résultats

Le tableau suivant donne les résultats de l'analyse des glucides. Moyenne de quatre dosages. Valeurs extrêmes ± 10 %.

	Lapin	*Rat*
Ac. N-acétyl-neuraminique	5,4 %	4,1 %
Galactose et mannose	6,6	4,7
Glucosamine	5,6	4,6
Fucose	0,3	0,4
	17,9 %	13,8 %
Fraction protéique	80,6 %	85 %
Oses	17,9	13,8
Total :	98,5 %	98,8 %

— *Rapport galactose-mannose :* les deux méthodes indiquent que Hp de Rat et Hp de Lapin contiennent deux fois plus de mannose que de galactose.

	Rapport des absorbances 475 mμ/516 mμ
Mélanges témoins { 2 G/1 M	1,12
Mélanges témoins { 1 G/1 M	1,18
Mélanges témoins { 2 M/1 G	1,24
Hp de Lapin	1,24
Hp de Rat	1,23

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

La composition différente des sérums de Lapin et de Rat nous a conduit à mettre au point deux méthodes différentes d'isolement de leurs haptoglobines.

L'étude de leurs propriétés physiques nous a montré que ces deux protéines n'étaient pas identiques et différaient de l'haptoglobine humaine.

L'analyse chimique confirme ces résultats en précisant que les différences existant entre les haptoglobines proviennent d'une différence de composition quantitative, mais non qualitative.

En dépit de ces divergences, ces trois protéines doivent posséder des centres actifs répartis de façon analogue. En effet, elles s'unissent toutes trois molécule à molécule aux diverses hémoglobines et les complexes hémoglobine-haptoglobine ainsi formés ont la même activité peroxydasique.

Dans le *Tableau IV*, nous rassemblons les principales constantes physiques et chimiques des haptoglobines de l'Homme, du Lapin et du Rat.

TABLEAU IV : *Constantes physiques et chimiques des Hp*

	Homme	*Lapin*	*Rat*
Poids moléculaire	85.000	74.000	60.000
pHi	4,1	3,85	4,45
$S°_{20,w}$	4,1	4,0-4,1	3,65
$\varepsilon \begin{matrix} 1\ mg/ml \\ 280\ m\mu \end{matrix}$	1,16	1,18	1,20
Azote %	11,3	12,3	14,6
Fraction protéique %	76,5	80,6	85
Fraction glucidique %	18,6	17,9	13,8

Deuxième partie

Catabolisme des haptoglobines de Lapin et de Rat

INTRODUCTION

Dans cette deuxième partie, nous étudierons le catabolisme de l'haptoglobine. Nous aurons donc à rechercher la vitesse avec laquelle cette protéine disparaît du plasma et ses formes d'élimination.

Pour déterminer ce qu'on appelle la « demi-vie » d'une protéine, plusieurs méthodes ont été proposées. Elles permettent de calculer le pool total de la protéine étudiée, sa distribution dans les différents espaces intra et extra-vasculaires, ainsi que le taux de catabolisme. Certaines méthodes admettant implicitement des hypothèses de base plus ou moins justifiées, nous les critiquerons et les comparerons entre elles. Ce travail fera l'objet du premier chapitre.

Dans le deuxième, nous exposerons les différentes techniques expérimentales concernant le marquage de la protéine, l'injection à l'animal et le comptage des échantillons sanguins et urinaires.

Enfin, dans le troisième chapitre, nous étudierons le catabolisme de Hp ^{131}I chez le Lapin et le Rat en appliquant aux données expérimentales les différentes méthodes de calcul décrites dans le deuxième chapitre. Nous terminerons par l'étude de la forme d'élimination des différents produits du catabolisme de Hp ^{131}I.

CHAPITRE I

CONSIDERATIONS THEORIQUES

Dans ce chapitre, nous exposerons les méthodes qui permettent de calculer la vitesse à laquelle une protéine est catabolisée par l'animal. Ces méthodes diffèrent entre elles par les hypothèses de base et par les moyens utilisés pour interpréter les phénomènes observés.

Auparavant, nous donnerons les définitions des termes que nous emploierons car, selon les auteurs et les techniques utilisées, ils n'ont pas toujours le même sens. Nous limitons cette étude au cas des protéines marquées par l'iode ^{131}I. Après catabolisme de la protéine, l'iodotyrosine est immédiatement désiodée ; elle n'est pas réutilisée par l'organisme qui élimine l'iode sous forme d'iodure. (Le problème est différent si la protéine est marquée par ^{14}C ou ^{3}H. L'animal peut alors réutiliser les acides aminés marqués.) A notre connaissance, seuls les auteurs anglo-saxons ont étudié ces problèmes, et, tout particulièrement, l'équipe de Mc FARLANE, à Londres. C'est pourquoi, dans notre exposé, nous ferons mention de leur terminologie devenue classique.

I. — DEFINITIONS

1) COMPARTIMENT

Désigne un espace homogène de distribution d'une substance (par ex., une protéine); il ne correspond pas nécessairement à une région anatomique définie. Dans la suite de ce travail, nous parlerons souvent des espaces ou compartiments extra et intra-vasculaires (EV + iV). L'espace extra-vasculaire peut comprendre plusieurs compartiments (correspondant aux divers organes, à la lymphe, etc.).

Les molécules de la protéine envisagée comprise dans un compartiment donné forment ce qu'on appelle un lot (« pool ») défini par son poids.

2) Rapport de distribution

C'est le rapport des dimensions de l'espace extra-vasculaire (ou la somme des espaces extra-vasculaires) au compartiment intra-vasculaire. Il n'est pas nécessairement le même pour toutes les protéines.

3) Taux partiel de catabolisme quotidien (*fractional catabolic rate*)

C'est la fraction de la quantité totale d'une protéine donnée présente dans un compartiment donné qui est catabolisée en un jour. Il s'exprime en % par jour. Il est normalement constant.

k_{iv} désigne le taux partiel de catabolisme intra-vasculaire.

k, appelé simplement taux de catabolisme, désigne le taux partiel de catabolisme du pool total (EV + iV).

4) Valeur absolue du taux de catabolisme

C'est le poids de cette protéine catabolisée par jour. Il s'exprime en g/jour. Il est égal au taux partiel de catabolisme multiplié par le poids de cette protéine contenu dans les espaces intra et extra-vasculaires. Pour une protéine non marquée, chez l'animal en équilibre, ce taux est constant. Pour une protéine marquée, la valeur absolue du taux de catabolisme décroît avec le temps, bien que la valeur relative reste constante. (On l'exprime également en g/jour/kg d'animal.)

5) Vitesse de renouvellement (*turnover rate*)

C'est la vitesse avec laquelle les protéines nouvellement synthétisées apparaissent dans un pool donné. Si l'organisme est en équilibre métabolique (« steady state »), il y a égalité entre ce qui apparaît (anabolisme) et ce qui disparaît (catabolisme) et la vitesse de renouvellement devient égale au taux relatif de catabolisme.

6) Demi-vie

La notion de demi-vie est tirée de l'étude des éléments radioactifs, qui se décomposent avec une vitesse constante. Si au temps $t = t_0$ on a un nombre N_0 d'atomes de cet élément, au temps t, il

en reste N. Pendant un court intervalle de temps dt, il s'en décompose dN, quantité proportionnelle à N et à une constante qui dépend de l'élément étudié. On a :

$$dN = - k\ N\ dt$$

On appelle *demi-vie* de l'élément le temps T au bout duquel il reste un nombre N d'atomes égal à la moitié de N_0. On l'appelle aussi *période* de l'élément. On a :

$$N = N_0\ e^{-kt}$$

Quand $N/N_0 = 1/2$, on a :

$$kT = \text{Log } 2 = 0{,}693$$

Il se trouve que la loi qui régit le catabolisme d'une protéine est la même. Dans les deux cas, elle est traduite par une fonction exponentielle. C'est pourquoi on parle également de demi-vie d'une protéine.

Au bout d'un certain temps, la courbe qui donne, en coordonnées semi-logarithmiques, la radioactivité du plasma en fonction du temps, présente une portion rectiligne de pente k_a. Elle permet de calculer le temps nécessaire pour que la moitié des molécules marquées disparaissent de la circulation : c'est la *demi-vie apparente*. La constante k_a est le *taux relatif de catabolisme apparent*.

On appelle *demi-vie réelle* le temps nécessaire pour que la moitié des protéines marquées soient catabolisées.

Nous verrons plus loin la raison de la distinction entre ces deux demi-vies.

II. — MODE D'EXPRESSION DES RADIOACTIVITES

A. — MESURE DU VOLUME PLASMATIQUE

Pour mesurer le volume plasmatique (espace intra-vasculaire), on utilise la méthode de dilution isotopique. A cet effet, on injecte dans une veine de l'animal un volume u d'une solution de protéine marquée dont l'activité S exprimée en c/mn/ml est connue. On prélève du sang au bout de 10, 20 et 30 minutes après l'injection. Le sang est centrifugé ; on mesure la radioactivité du plasma, soit R_P, exprimée également en c/mn/ml. On porte sur un graphique les résultats obtenus, en coordonnées semi-logarithmiques, en fonction du temps. On

obtient ainsi une droite dont le prolongement coupe l'axe des ordonnées en un point A. Il donne la valeur de la radioactivité plasmatique au temps initial, telle qu'elle aurait été si le brassage du produit marqué dans le sang avait été instantané. Soit V_P le volume plasmatique. On a :

$$V_P \cdot A = u.S,$$

équation d'où on tire V_P.

Certains auteurs se contentent de mesurer la radioactivité R_P au bout de 10 minutes, et de multiplier sa valeur par 1,015 pour avoir sa valeur au temps zéro.

B. — RADIOACTIVITÉ PLASMATIQUE

Chaque jour, on prélève du sang à l'animal en expérience. Sur un volume connu de plasma, on mesure la radioactivité plasmatique R_P exprimée en c/mn/ml.

On vérifie que la teneur du plasma en protéines est constante, sinon on corrige la valeur trouvée d'après l'hématocrite *.

La radioactivité totale du plasma est $V_P \cdot R_P$. On peut la rapporter à la radioactivité totale de la dose D injectée. On obtient ainsi :

$$Q_P = R_P \cdot V_P/D,$$

exprimée en pourcentage de D.

C. — RADIOACTIVITÉ URINAIRE

Chaque jour, on évalue la radioactivité excrétée en multipliant l'activité de l'urine R_U en c/mn/ml par le volume V_U des urines recueillies au cours de ces 24 heures.

La radioactivité urinaire quotidienne peut s'exprimer en pourcentage de la dose injectée :

$$Q_U = R_U \cdot V_U/D$$

On est également amené à additionner les radioactivités excrétées chaque jour. On obtient ainsi une quantité dite cumulative $Q_{U\ cum.}$

(*) L'expérience nous a montré que les animaux en expérience étaient susceptibles de boire de façon très irrégulière, ce qui avait pour effet de faire varier sensiblement la teneur en eau du plasma. C'est pourquoi, pour chaque prise de sang, nous déterminons l'hématocrite dont la valeur nous fournit le moyen de ramener tous les plasmas à une teneur constante en protéines.

Représentée en coordonnées cartésiennes, elle donne une courbe qui part de l'origine des axes, croît et tend vers l'horizontale 100 % de D, sans jamais l'atteindre, à cause des pertes de la radioactivité par les fèces, les poils et celles que l'on peut difficilement éviter dans la collecte des urines.

D. — RADIOACTIVITÉ EXTRA-VASCULAIRE

On ne peut la mesurer directement, mais simplement par différence. Deux moyens sont possibles.

Lorsque l'on opère sur de petits animaux, rats ou souris, on peut les placer dans une enceinte entourée de compteurs de Geiger-Müller. Le rendement de l'appareil étant connu par étalonnage avec une source liquide d'activité connue et mise dans l'enceinte à la place des animaux, on peut déterminer la radioactivité totale contenue par les animaux en expérience, soit Q_T. Connaissant la radioactivité totale plasmatique Q_P, on obtient celle des espaces extra-vasculaires par différence :

$$Q_{EV} = Q_T - Q_P$$

Cette méthode peut difficilement s'appliquer à des animaux plus gros. On tourne alors la difficulté par la mesure de la quantité excrétée. La radioactivité Q_T restant dans le corps est égale à la dose injectée moins la quantité excrétée :

$$Q_T = D - Q_{U\ cum}$$

III. — DESCRIPTION ET INTERPRETATION DES FAITS OBSERVES

Pour étudier le sort d'une protéine plasmatique, la méthode classique consiste à injecter à l'animal, par voie intra-veineuse, une petite quantité de cette protéine marquée, telle que son introduction ne crée pas une surcharge qui modifierait l'équilibre biologique de l'animal. On suppose également que la protéine marquée n'est pas distinguée par l'organisme de la protéine native, de sorte que le sort de la protéine marquée traduise bien celui de la même protéine synthétisée *in vivo*.

Sur la courbe qui représente, en coordonnées semi-logarithmiques, la radioactivité du plasma en fonction du temps, nous distinguerons trois parties qui correspondent à trois phases successives de l'expérience.

• PREMIÈRE PHASE :

La période initiale est caractérisée par une baisse rapide de la radioactivité plasmatique. Selon la protéine étudiée, cette phase dure de un à sept ou huit jours.

Cette chute est due essentiellement au fait que la protéine marquée sort de l'espace intra-vasculaire pour se mêler à la protéine non marquée répartie dans le pool extra-vasculaire. Ce brassage est d'autant plus long que le pool est plus vaste, autrement dit que l'organisme est plus riche en cette protéine.

Deux autres causes provoquent aussi cette chute : le catabolisme normal de la protéine marquée, pendant cette période ; le catabolisme accéléré de la fraction dénaturée, si le marquage par I^{131} a donné, en partie, une protéine que l'organisme ne reconnaît plus comme native.

Pour analyser le phénomène, on peut, en première approximation, assimiler l'organisme à un système à deux compartiments, le pool intra-vasculaire (iV), et le pool extra-vasculaire (EV). Dans le premier pénètre la protéine nouvellement synthétisée par l'animal. Les produits du catabolisme en sortent avec une constante de vitesse k_{12}. On suppose ainsi que le catabolisme se produit dans le comportiment iV ou dans un autre site connexe, qui est lié à iV par des échanges rapides et faciles. Le second compartiment EV fonctionne comme un réservoir. Entre les deux se produisent des échanges selon les constantes de vitesse k_{13} (dans le sens iV vers EV) et k_{31} en sens inverse (*fig. 10*).

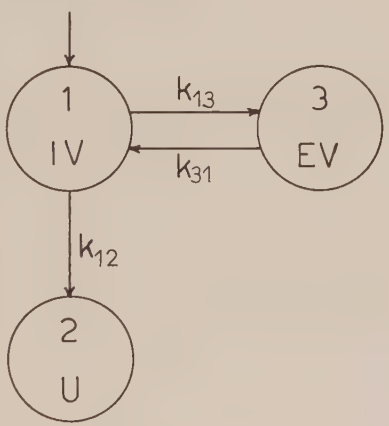

FIG. 10 : Représentation schématique d'un système à deux compartiments

1 : compartiment intra-vasculaire
3 : compartiment extra-vasculaire
2 : excrétion urinaire

Au temps $t = 0$, la radioactivité est injectée dans l'espace iV. En quelques minutes, elle se répartit uniformément dans le plasma total. Puis elle commence à diffuser par les capillaires vers les espaces EV, avec une vitesse proportionnelle à k_{13}. En même temps, de façon symétrique, la radioactivité EV, nulle à $t = 0$, augmente, d'abord de façon rapide, puis plus lentement, jusqu'à ce que l'activité spécifique, c'est-à-dire la radioactivité des molécules marquées rapportée au poids total des molécules de cette même protéine, soit la même dans iV et dans EV. La courbe qui représente la radioactivité EV passe donc par un

maximum au temps t = t_1 que l'on appelle *temps d'équilibre vrai*. A ce moment, s'il y a encore des échanges entre les deux compartiments, ils ne modifient pas les activités spécifiques (*fig. 11*).

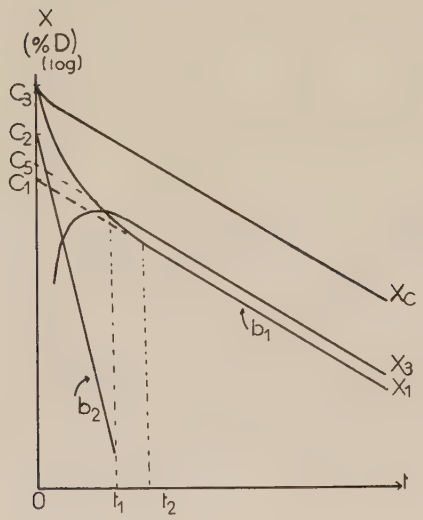

Fig. 11 : Analyse compartimentale
Coordonnées semi-logarithmiques
Représentation schématique des courbes de l'activité plasmatique X_1, de l'activité extra-vasculaire X_3 et de l'activité retenue par le corps X_C
Décomposition graphique de la courbe de l'activité plasmatique en deux droites de pente b_1 et b_2
X_1, X_3 et X_C sont exprimés en % de la dose injectée D
t_1 = temps d'équilibre vrai
t_2 = temps d'équilibre apparent

- Deuxième phase :

En fait, l'équilibre que nous venons de définir est instable, éphémère. La courbe qui représente la radioactivité EV commence à descendre ; celle de la radioactivité iV n'a pas cessé de décroître. A un certain temps t_2, la décroissance de la radioactivité iV devient linéaire en coordonnées semi-logarithmiques ; celle de la radioactivité EV lui est parallèle. Il s'agit donc, à partir de t_2, d'une décroissance selon une loi exponentielle.

La deuxième phase, celle qui s'écoule entre t_1 et t_2, constitue une phase de transition, pendant laquelle se poursuit le catabolisme iV et un appel de protéine marquée du réservoir EV vers le site de catabolisme.

- Troisième phase :

Elle commence au temps t_2. Elle est caractérisée par le parallélisme des deux courbes iV et EV (*fig. 11*). Elle représente « *l'état d'équilibre isotopique* ».

t_2 est appelé *temps d'équilibre apparent*. La décroissance exponentielle n'est pas due au seul catabolisme de la protéine marquée et à son remplacement par la protéine nouvellement synthétisée. Pendant toute la troisième phase, un continuel brassage se poursuit, une continuelle redistribution de la radioactivité. Des molécules marquées de EV passent dans iV pour en compenser les pertes, par suite du catabolisme.

C'est pourquoi la demi-vie calculée à partir de la pente k_a à $t = t_2$ est appelée *demi-vie apparente*.

La demi-vie *réelle* est donnée par la pente de la tangente à la courbe de radioactivité iV pour $t = t_1$. La valeur de k trouvée au temps d'équilibre vrai est le taux de catabolisme vrai $= k_{iV}$.

En principe, lorsque les vitesses d'échange entre les deux compartiments sont beaucoup plus grandes que la vitesse de dégradation, la période d'équilibration devrait être extrêmement courte et le temps t_2 devrait presque coïncider avec le temps t_1 d'équilibre vrai. En fait, deux causes très différentes peuvent retarder l'apparition du temps d'équilibre apparent :

— D'une part, si la diffusion n'est pas complète au temps d'équilibre vrai, elle peut se prolonger dans des espaces nouveaux avec une vitesse inférieure à celle de la première. Le temps t_2 n'apparaîtra que lorsque cette diffusion lente aura pris fin.

— D'autre part, au cours du marquage par l'iode, certaines molécules de Hp fixent un atome d'iode par molécule ; d'autres en fixent davantage. Ces dernières, considérées par l'animal comme moins physiologiques, sont éliminées dans les deux ou trois premiers jours. Ce n'est que lorsque la population des molécules sera devenue homogène que l'équilibre isotopique pourra s'établir.

IV. — METHODES DE CALCUL

Pour étudier le catabolisme d'une protéine marquée, plusieurs méthodes ont été proposées par différents auteurs. Les premiers (Berson, Sterling), sans se référer explicitement à un modèle théorique, ont établi, à partir des données expérimentales, une méthode permettant de calculer le taux de catabolisme ainsi que le rapport de distribution EV/iV. A leur suite, d'autres, guidés par ces résultats, construisent, à partir d'un nombre limité d'hypothèses de base, un modèle théorique. Ils établissent ainsi un ensemble d'équations générales qui rendent compte d'une manière systématique des phénomènes observés.

Rescigno [72] a proposé une théorie qui interprète de manière quantitative la distribution d'un produit marqué dans un système à n compartiments. Matthews [58] a repris cete analyse et l'a adaptée au cas des protéines plasmatiques. D'autres modèles plus ou moins complexes ont été également proposés [23, 48, 71].

L'analyse compartimentale a l'avantage de fournir un ensemble d'équations de validité générale lorsque l'animal est en état d'équilibre dynamique. Par contre, les méthodes plus empiriques, serrant de plus près les faits expérimentaux, permettent de déceler, lorsque l'animal n'est pas en état d'équilibre, la cause de cette variation et d'y remédier.

Pour bénéficier de ces avantages, en nous inspirant de l'analyse de MATTHEWS, nous avons établi un modèle à trois compartiments (un compartiment central relié par des échanges réversibles à un compartiment extérieur, et un pool urinaire). Puis nous avons cherché comment les méthodes plus empiriques pouvaient s'y ramener.

Nous exposerons notre modèle et nous montrerons ensuite comment il permet de dégager les hypothèses implicites des autres méthodes et d'établir leurs conditions de validité.

A. — ANALYSE COMPARTIMENTALE

1) Théorie

Considérons un système très général constitué par n compartiments entre lesquels s'échange une substance marquée.

Dans chaque compartiment, la radioactivité présente à tout moment dépend de ce qui entre dans ce compartiment et de ce qui en sort ; on peut donc écrire d'une manière générale :

$$\frac{dX_i}{dt} = \sum_{j=1}^{n} k_{ji} X_j - \sum_{j=1}^{n} k_{ij} X_i \quad (i = 1, 2, \ldots, n)$$

où :

X_i représente la fraction de la dose totale de la substance marquée présente dans le compartiment i ;

k_{ij} représente la constante de vitesse réglant le passage de la substance considérée du compartiment i dans le compartiment j. Les k dont les deux indices sont identiques sont nuls.

Pour évaluer la distribution de la protéine marquée dans l'organisme, on peut assimiler celui-ci à un système à trois compartiments, cas particulier du système très général que nous avons envisagé ci-dessus.

Ce système comporte un compartiment central (1) représentant l'espace iV, un compartiment extra-vasculaire (3) qui est en équilibre réversible avec le premier et un compartiment urinaire (2) qui reçoit les produits de dégradation de la protéine catabolisée dans le compartiment (1). La protéine marquée est injectée dans le compartiment iV (*fig. 10*).

Comme hypothèses de base, nous admettons que :

— la molécule marquée se comporte de façon identique à la molécule non marquée ;

— l'organisme est en état d'équilibre dynamique, c'est-à-dire que les quantités de protéines présentes dans les compartiments iV et EV restent constantes ; en d'autres termes, les constantes de vitesse réglant les échanges d'un compartiment à l'autre restent fixes au cours du temps ; et le catabolisme et l'anabolisme s'effectuent dans le même compartiment (iV) avec des vitesses égales (équilibre métabolique) ;
— le volume du compartiment iV reste constant ;
— le brassage des molécules marquées avec les molécules non marquées se fait très rapidement dans l'un et l'autre compartiment iV et EV.

Dans le cas particulier que nous envisageons (*fig. 11*), si nous posons $k_1 = k_{12} + k_{13}$, l'ensemble des équations différentielles devient :

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_1 X_1 + k_{31} X_3 \qquad (1)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12} X_1 \qquad (2)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13} X_1 - k_{31} X_3 \qquad (3)$$

X_1 représente la fraction de la dose injectée X demeurée dans le pool iV ;
X_2 représente la fraction de X éliminée dans le pool urinaire ;
X_3 représente la fraction de X passée dans le pool EV.

Les solutions générales de ces équations sont :

$$X_1 = C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t} \qquad (4)$$

$$X_2 = 1 - C_3 e^{-b_1 t} - C_4 e^{-b_2 t} \qquad (5)$$

$$X_3 = C_5 e^{-b_1 t} + C_6 e^{-b_2 t} \qquad (6)$$

La fraction de la dose injectée retenue par le corps, $X_c = 1 - X_2$, est donc représentée par l'équation (7) :

$$X_c = C_3 e^{-b_1 t} + C_4 e^{b_2 t} \qquad (7)$$

A partir de ces équations, on peut calculer les valeurs respectives des constantes (C), des constantes de vitesse (k) et des exposants (b) (voir note 3, page 126).

On obtient les relations suivantes :

$$C_2 = 1 - C_1 \qquad (8)$$

$$C_4 = 1 - C_3 \qquad (9)$$

$$C_6 = -C_5 \qquad (10)$$

$$C_1 = \frac{k_{31} - b_1}{b_2 - b_1} \qquad (11)$$

$$C_3 = \frac{k_{12}(k_{31} - b_1)}{b_1(b_2 - b_1)} \qquad (12)$$

$$C_5 = \frac{k_{13}}{b_2 - b_1} \qquad (13)$$

$$k_{12} = \frac{1}{\frac{C_1}{b_1} + \frac{C_2}{b_2}} \qquad (14)$$

$$k_{12} = \frac{C_3 \cdot b_1}{C_1} \qquad (14\ bis)$$

$$k_{13} = \frac{C_1 C_2 (b_2 - b_1)^2}{C_1 b_2 + C_2 b_1} \qquad (15)$$

$$k_{31} = C_1 b_2 + C_2 b_1 \qquad (16)$$

2) Analyse graphique

On trace en coordonnées semi-logarithmiques les courbes représentant les radioactivités plasmatique, extra-vasculaire et la radioactivité totale retenue par le corps exprimée en pourcentage de X. Ces courbes représentent les équations (4), (5) et (7) (*fig. 11*).

La courbe de l'activité plasmatique peut être décomposée en deux droites. La première s'obtient en prolongeant la portion linéaire de la courbe jusqu'à sa rencontre avec l'axe des ordonnées, la seconde en soustrayant graphiquement cette droite de la courbe initiale.

C_1 et C_2 sont les intersections de ces droites avec l'axe des ordonnées et $-b_1$ et $-b_2$ sont leur pente.

C_3 et C_5 sont obtenus en prolongeant les portions linéaires de la courbe d'activité retenue par le corps et de la courbe d'activité extra-vasculaire (*fig. 11*).

a) Calcul des constantes k :

Connaissant par le graphique les valeurs de b_1, b_2, C_1, C_2 et C_5, on en déduit les valeurs du taux partiel de catabolisme k_{12} et des constantes de diffusion k_{13} et k_{31} en portant ces valeurs dans les équations (14), (15) et (16).

b) Rapport de distribution ev/iv :

Si on admet que la molécule marquée obéit aux mêmes lois cinétiques que la molécule non marquée et qu'elles subissent toutes deux

un catabolisme identique, on peut appliquer à la protéine non marquée les équations (1) et (3).

Appelons Y_1 et Y_3 les quantités de protéine (définies par leur poids) présentes respectivement dans les compartiments iV et EV, et Z la valeur absolue du taux d'anabolisme. Puisque l'organisme garde l'état d'équilibre, on a la relation suivante :

$$Z - (k_{13} + k_{12})\ Y_1 + k_{31} Y_3 = 0 \qquad (17)$$

Puisque, par hypothèse, anabolisme et catabolisme s'effectuent dans le compartiment iV avec des vitesses égales, on a également :

$$Z = k_{12} Y_1 \qquad (18)$$

D'où on tire de (17) et (18) :

$$k_{13} Y_1 - k_{31} Y_3 = 0 \qquad (19)$$

Cette relation exprime qu'une égale quantité de protéine passe en l'unité de temps dans chaque direction entre les compartiments iV et EV.

L'équation (19) peut se mettre sous la forme :

$$\frac{k_{13}}{k_{31}} = \frac{Y_3}{Y_1} \qquad (20)$$

En remplaçant les constantes k_{13} et k_{31} par leurs valeurs, on obtient :

$$\frac{Y_3}{Y_1} = \frac{C_1 C_2 (b_2 - b_1)^2}{(C_1 b_2 + C_2 b_1)^2} \qquad (21)$$

qui est la valeur du rapport de distribution EV/iV.

Ainsi, à partir des trois équations posées au début de cette analyse, et moyennant quelques hypothèses communément admises, nous avons déterminé les valeurs des taux de catabolisme, des constantes de diffusion, et retrouvé par le calcul la valeur du rapport de distribution.

B. — MÉTHODE DU TEMPS D'ÉQUILIBRE

Cette méthode a été préconisée par Campbell et coll. [14]. Leur démonstration, quoique aboutissant à des conclusions valables, repose sur des hypothèses injustifiées. Nous l'avons reprise sur d'autres bases et intégrée dans la méthode d'analyse compartimentale que nous avons exposée ci-dessus.

Nous avons vu que la courbe d'activité extra-vasculaire passe par un maximum.

A ce moment : $\frac{dX_3}{dt} = 0.$

L'équation (3) devient :

$$\frac{k_{13}}{k_{31}} = \frac{X_3 \text{ max}}{X_1 \text{ max}} \qquad (22)$$

Des équations (20) et (22), on tire :

$$\frac{X_3 \text{ max}}{Y_3} = \frac{X_1 \text{ max}}{Y_1} \qquad (23)$$

Au temps d'équilibre vrai t_1, les activités spécifiques sont égales dans les deux compartiments EV et iV, l'équation (23) le démontre. De plus, l'équation (23) nous permet de justifier deux méthodes de calcul, l'une servant à établir le rapport de distribution EV/iV, l'autre le taux de catabolisme IV.

En effet :

1° L'équation (23) peut s'écrire :

$$\frac{X_1 \text{ max}}{X_3 \text{ max}} = \frac{Y_1}{Y_3} \qquad (24)$$

En d'autres termes, au temps $t = t_1$, les activités totales des compartiments iV et EV sont entre elles comme les masses de leur lot respectif.

2° Lorsque $\frac{dX_3}{dt} = 0$, l'équation (1) devient :

$$\frac{dX_1}{dt} = k_{12} X_1 \text{ max} \qquad (25)$$

Cette relation signifie qu'au temps t_1, la vitesse de disparition de l'activité plasmatique est égale au taux partiel de catabolisme iV. Celui-ci peut être déterminé graphiquement par la pente de la tangente menée à la courbe des activités plasmatiques au temps d'équilibre. A ce moment, la tangente à la courbe des activités extra-vasculaires devient une horizontale ($\frac{dX_2}{dt} = 0$).

Critique

Cette méthode présente un avantage. Elle ne nécessite pas une longue expérience puisque le temps d'équilibre t_1 est rapidement atteint. Par contre, la détermination précise de t_1 n'est pas facile. En effet, la courbe de radioactivité extra-vasculaire présente un arrondi qui rend difficile la localisation précise du maximum. Enfin si la protéine marquée injectée est en partie dénaturée, la radioactivité excrétée pendant les premiers jours présente une valeur anormalement élevée. L'estimation des radioactivités extra-vasculaires sera inexacte et la courbe EV présentera au maximum une valeur inférieure à sa valeur réelle. Le rapport de distribution, par voie de conséquence, aura une valeur trop faible.

C. — MÉTHODE DE DISTRIBUTION DES ACTIVITÉS

Le principe de la démonstration a été emprunté à CAMPBELL et coll. [14]. Nous l'avons appliqué aux équations établies par la méthode d'analyse compartimentale. Cette méthode permet de calculer le rapport de distribution EV/iV.

L'expérience montre que lorsque le temps d'équilibre apparent est atteint, la courbe de l'activité plasmatique, celle de l'activité EV ainsi que celle de l'activité retenue par le corps deviennent des droites parallèles. Les équations (4), (6) et (7), au bout d'un temps $T > t_1$, deviennent fonction exponentielle du temps et puisque $-b_2 > -b_1$, la seconde exponentielle en b_2 devient négligeable.

Au bout d'un temps $T > t_1$, on peut remplacer les équations (4), (5) et (7) par les équations simplifiées :

$$X_1 = C_1 \, e^{-b_1 t} \qquad (26)$$

$$X_3 = C_5 \, e^{-b_1 t} \qquad (27)$$

$$X_c = C_3 \, e^{-b_1 t} \qquad (28)$$

En remplaçant C_1, C_3 et C_5 par leur valeur donnée par les équations (11), (12) et (13), on obtient :

$$\left(\frac{X_3}{X_1} \right)_T = \frac{C_5}{C_1} = \frac{k_{13}}{k_{31} - b_1} \qquad (29)$$

$$\left(\frac{X_c}{X_1} \right)_T = \frac{C_3}{C_1} = \frac{k_{12}}{b_1} \qquad (30)$$

Si nous supposons que pendant l'état d'équilibre isotopique, les radioactivités spécifiques sont égales dans les deux compartiments EV et iV, on peut écrire :

$$\frac{Y_3}{Y_1} = \frac{k_{13}}{k_{31} - b_1} = \frac{k_{12}}{b_1} - 1 \qquad (31)$$

D'après (31), le rapport de distribution EV/iV est égal au rapport du taux partiel de catabolisme iV (k_{12}) au taux de catabolisme apparent (b_1) moins l'unité.

Critique

Cette méthode ne donne qu'une valeur limite supérieure du rapport de distribution. Nous pouvons démontrer en effet que pendant l'état d'équilibre isotopique, l'activité spécifique du compartiment EV est supérieure à celle du compartiment iV.

Puisque l'organisme est supposé être en état d'équilibre dynamique, nous savons que la relation (20) est toujours vraie.

En divisant (29) par (20), on a :

$$\frac{X_3/Y_3}{X_1/Y_1} = \frac{k_{31}}{k_{31} - b_1} \qquad (32)$$

L'activité spécifique du compartiment EV est donc supérieure à celle du compartiment iV. Elles ne sont sensiblement égales que si le taux de catabolisme apparent (b_1) est négligeable par rapport à la constante de diffusion k_{31}.

D. — MÉTHODE DE STERLING [83]

1) Taux de catabolisme

Sterling détermine le taux de catabolisme à partir de la portion linéaire de la courbe des activités plasmatiques. La pente de cette droite mesure le taux de catabolisme k.

2) Rapport de distribution

Prolongeant la partie linéaire de la courbe des activités plasmatiques jusqu'à sa rencontre avec l'axe des ordonnées, il obtient en ce point C_1 la valeur qu'aurait eue la radioactivité plasmatique initiale

si la diffusion de la protéine marquée avait été instantanée. Il en déduit la valeur du rapport de distribution établi, selon lui, d'après la formule :

$$\frac{Y_3 + Y_1}{Y_1} = \frac{1}{C_1} \qquad (33)$$

3) Critique

En identifiant le taux de catabolisme apparent au taux de catabolisme vrai, STERLING admet implicitement :

— soit que le catabolisme, au cours de la diffusion, se poursuit dans les deux compartiments selon la même constante de vitesse ;

— soit que, le catabolisme étant uniquement iV, les échanges entre les deux compartiments sont extrêmement rapides. Il en résulte que, dans un cas comme dans l'autre, les activités spécifiques sont égales dans les deux compartiments pendant le temps d'équilibre isotopique. Nous sommes ainsi ramené, pour le calcul du rapport EV/iV, à la méthode de distribution qui effectue la même simplification. En effet, en comparant (30) et (31), on peut écrire, si on tient compte que $C_3 \approx 1$:

$$\left(\frac{X_c}{X_1} \right)_T = \frac{1}{C_1} = \frac{Y_3 + Y_1}{Y_1} \qquad (34)$$

On retrouve ainsi l'équation (33).

E. — MÉTHODE DE BERSON [5]

1) Rapport de distribution (*fig. 12*)

Pour déterminer le rapport de distribution, BERSON trace ce qu'il appelle la courbe de distribution. Celle-ci s'obtient en rapportant les radioactivités plasmatiques aux radioactivités totales retenues par le corps du jour correspondant. Cette courbe devient une droite parallèle à l'axe des abscisses au bout de quelques jours, lorsque le temps d'équilibre isotopique est atteint. Cette droite prolongée coupe l'axe des ordonnées en un point P_1. Ce point indique la fraction constante de l'activité totale retenue par le corps, présente dans le compartiment iV, après le temps d'équilibre. D'après (30) et (31), on a :

$$P_1 = \left(\frac{X_1}{X_c} \right)_T = \frac{Y_1}{Y_1 + Y_3}$$

expression identique à l'équation (34).

2) Critique

Comme celle de STERLING, cette méthode se ramène en principe à celle de distribution des activités. Elles admettent toutes trois que les activités des compartiments EV et iV sont égales après le temps d'équilibre. Elles ne donnent qu'une valeur limite du rapport de distribution.

Dans la pratique, la méthode de BERSON présente un avantage sur la précédente. La courbe de l'activité plasmatique, en effet, décèle la présence de molécules dénaturées. Leur catabolisme plus rapide a pour effet d'accentuer la chute initiale de la radioactivité plasmatique et de retarder l'apparition du temps d'équilibre t_2. De ce fait, on obtient, par la méthode d'extrapolation, une valeur de C_1 trop faible et le rapport de distribution donne une valeur trop élevée. La méthode de BERSON, par contre, n'est pas exposée à cette cause d'erreur puisque la courbe de distribution tient compte de l'élimination urinaire et n'est donc pas sensible à la présence de molécules à demi-vie courte. Elle reflète uniquement les variations de l'activité plasmatique résultant de la diffusion. Elle permet de déceler les anomalies éventuelles (transfert par ex.).

3) Taux de catabolisme

Selon BERSON, le taux de catabolisme k est donné par deux séries indépendantes de données expérimentales, à savoir les radioactivités plasmatiques et les radioactivités urinaires.

1) Le taux de catabolisme est donné par la pente de la portion linéaire de la courbe de l'activité plasmatique : $k = -b_1$.

2) Il est également donné par le taux d'excrétion urinaire k_u.

Pour l'obtenir, BERSON trace deux courbes. La première, appelée courbe d'excrétion urinaire, s'obtient en portant dans un graphique en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps les fractions de D excrétées quotidiennement. C'est la courbe ΔX_2 (*fig. 13*). La deuxième, appelée courbe du taux d'excrétion urinaire moyen, s'obtient en rapportant pour chaque jour la valeur de ΔX_2 à l'activité retenue par le corps X_c du jour correspondant (*fig. 12*). Chaque valeur de $\Delta X_2/X_c$ ainsi trouvée donne la fraction de la radioactivité totale du corps qui est excrétée par jour. C'est donc un taux d'excrétion urinaire. Prolongeons la partie linéaire de cette courbe jusqu'à sa rencontre avec l'axe des ordonnées. Le point d'intersection E indique le taux d'excrétion urinaire moyen. Appelons-le k_u pour le distinguer du taux partiel d'excrétion urinaire k_{12}.

La pente de la courbe X_c doit en principe donner la même valeur k_u.

En admettant que les iodures provenant du catabolisme de la protéine marquée sont excrétés quantitativement dans les urines, le taux d'excrétion urinaire k_u représente, selon BERSON, le taux de catabolisme k. On a $k = k_u = — b_1$.

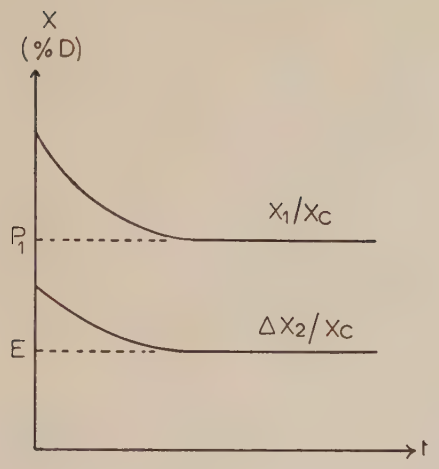

FIG. 12 : Méthode de BERSON
— Courbe de distribution X_1/X_c : radioactivité plasmatique rapportée à la fraction de la dose D qui reste dans le corps
— Courbe du taux moyen d'excrétion urinaire $\Delta X_2/X_c$: fraction de la radioactivité du corps excrétée chaque jour

4) Critique

1) BERSON admet qu'après le temps d'équilibre, une fraction constante de la radioactivité totale du corps est excrétée dans les urines. En d'autres termes, il suppose que les droites des radioactivités urinaires et des radioactivités totales du corps deviennent parallèles après le temps d'équilibre. Leur pente mesure le taux d'excrétion urinaire $k_u = — b_1$.

Il en est bien ainsi en effet.

Après le temps $T > t_2$, la relation (5) peut s'écrire :

$$X_2 (T) = 1 — C_3 e^{-b_1 t} \qquad (35)$$

La radioactivité excrétée pendant Δt est égale à :

$$\Delta X_2 (T, \Delta t) = X_2 (T + \Delta t) — X_2 (T)$$

$$\Delta X_2 = — C_3 e^{-b_1 t} (e^{-b_1 \Delta t} — 1)$$

$$\Delta X_2 = C_3 e^{-b_1 t} \left[b_1 \Delta t — \left(\frac{b_1 \Delta t}{2}\right)^2 + \left(\frac{b_1 \Delta t}{6}\right)^3 \ldots \right]$$

Si Δt = l'unité de temps = 1 jour, on a :

$$\Delta X_2 \ (T, \ \Delta t = 1) = b_1 C_3 \ e^{-b_1 t} \ [1 - \varphi \ (b_1)] \qquad (36)$$

$$[1 - \varphi \ (b_1)] = 1 - \frac{b_1}{2} + \frac{b_1^2}{6} - \ ... \ = C^{te}$$

L'équation (36) montre que la courbe d'excrétion urinaire devient, au bout du temps T, une droite dont la pente est égale à celle des activités retenues par le corps.

Si la fonction $1 - \varphi \ (b_1)$ ne diffère pas beaucoup de l'unité, l'équation (36) devient :

$$\Delta X_2 \ (T, \ \Delta t = 1) \approx b_1 C_3 \ e^{-b_1 t} \qquad (37)$$

Le taux d'excrétion urinaire k_u peut, dans ce cas, être assimilé à b_1. On a en effet, en tenant compte de (28) :

$$k_u = \frac{\Delta X_2 \ (T, \ \Delta t = 1)}{X_C} \approx b_1$$

2) La méthode de Berson, comme celle de Sterling, admet que le catabolisme a lieu dans l'un et l'autre compartiment avec une vitesse proportionnelle à b_1. Mais si on admet que le catabolisme de la protéine est exclusivement intra-vasculaire, la pente de la droite de l'activité plasmatique reflète, en plus du catabolisme de la protéine, les effets de redistribution de la protéine marquée entre les deux compartiments. A la limite cependant, si les vitesses de transfert entre les compartiments sont grandes par rapport à la vitesse de catabolisme, on peut admettre que $- b_1 = k_u$ représente le taux de catabolisme de la protéine.

F. — MÉTHODE DE LA CLEARANCE

Cette méthode a été proposée par Mc Farlane [14]. Par hypothèse, il admet que le catabolisme de la protéine est intra-vasculaire. Si la vitesse de dégradation obéit à une cinétique d'ordre 1, la radioactivité excrétée dans l'unité de temps (24 h) rapportée à la radioactivité plasmatique moyenne du jour correspondant doit être une constante. Celle-ci, appelée taux partiel d'excrétion urinaire, représente également le taux partiel de catabolisme iV (k_{12}).

Si X_2 ($\Delta t = 1$) représente la fraction de D injectée, excrétée en un jour, et X_1 la fraction de D injectée présente dans le compartiment iV, on a :

$$k_{12} = \frac{\Delta X_2 \ (\Delta t = 1)}{X_1}$$

Cette relation est vraie également pour un temps $T > t_2$.

On a donc :

$$k_{12} = \frac{\Delta X_2 \ (T, \Delta t = 1)}{X_1}$$

En remplaçant ΔX_2 (T, $\Delta t = 1$) et X_1 par leur valeur donnée par les équations (37) et (27), on obtient :

$$k_{12} \approx \frac{C_3 \cdot b_1}{C_1}$$

relation déjà trouvée lorsque l'équation (30) a été établie.

Le taux partiel d'excrétion urinaire est donc bien égal au taux partiel de catabolisme iV.

Critique

Dans la pratique, cette méthode présente un avantage sur la méthode d'analyse compartimentale. Elle permet de tenir compte du temps de latence nécessaire à l'animal pour éliminer les iodures radioactifs. Pour cela, on rapporte la radioactivité urinaire quotidienne à la radioactivité plasmatique prise 6 heures avant le temps moyen (= 12^e heure) du jour correspondant.

CONCLUSION

Lorsque *l'organisme est en état d'équilibre,* nous disposons de trois méthodes pour calculer le taux de catabolisme iV :

1) la méthode d'analyse compartimentale ;
2) la méthode du temps d'équilibre ;
3) la méthode de la clearance.

Pour calculer le rapport de distribution, nous disposons de deux méthodes :

1) celle qui dérive du calcul des constantes k_{13} et k_{31} ;
2) la méthode du temps d'équilibre.

La méthode de distribution des activités et celles qui lui sont assimilables, c'est-à-dire les méthodes d'extrapolation de STERLING et de BERSON, ne donnent qu'une valeur approximative de ce rapport. Toutefois, lorsque les vitesses de transfert entre les compartiments EV et iV sont grandes par rapport au taux de catabolisme, la valeur trouvée par cette méthode est très voisine de la valeur obtenue par les deux autres méthodes.

Lorsque *l'organisme n'est plus en état d'équilibre,* les courbes des radioactivités plasmatique, extra-vasculaire, urinaire ainsi que la courbe d'activité totale du corps ne sont plus parallèles pendant le temps dit d'équilibre isotopique. Plusieurs causes peuvent être intervenues : vitesse accrue soit de l'anabolisme, soit du catabolisme, transfert de protéines marquées d'un compartiment à un autre... Dans ce cas, il faut distinguer les méthodes qui font appel aux seules données plasmatiques et celles qui sont basées uniquement sur les radioactivités urinaires. Les premières sont surtout sensibles aux facteurs affectant les vitesses d'anabolisme et d'échange entre les compartiments, les dernières dépendent davantage du catabolisme de la protéine marquée. La comparaison des résultats donnés par les différentes méthodes exposées plus haut permet ainsi de détecter la véritable cause du déséquilibre. Dans ce but, nous utiliserons surtout les courbes de distribution et d'excrétion urinaire. La cause du déséquilibre une fois connue, nous appliquerons la méthode la plus appropriée au cas envisagé.

V. — SITE DU CATABOLISME DE Hp

Le site exact du catabolisme de Hp reste encore un problème discuté. Mc FARLANE a cependant montré, par un argument indirect, que le catabolisme des protéines plasmatiques, telles que l'albumine et les β-globulines, avait lieu dans le compartiment iV ou dans un compartiment qui lui est très étroitement relié.

Il constate en effet que la radioactivité urinaire quotidienne représente, à partir du premier jour qui suit l'injection de protéine marquée, une fraction constante de la radioactivité plasmatique moyenne correspondante. Par contre, le taux d'excrétion urinaire, exprimé en pourcentage de la radioactivité totale retenue par le corps, varie au cours des premiers jours. Une fois le temps d'équilibre isotopique atteint, il devient constant puisque, à partir de cet instant, les courbes d'excrétion urinaire et de la radioactivité retenue par le corps deviennent parallèles (*fig. 13*). On peut donc en conclure que, avant la

période d'équilibre isotopique, au moment où la protéine marquée n'est pas encore également répartie dans les deux pools, seule la fraction présente dans le compartiment iV subit la dégradation.

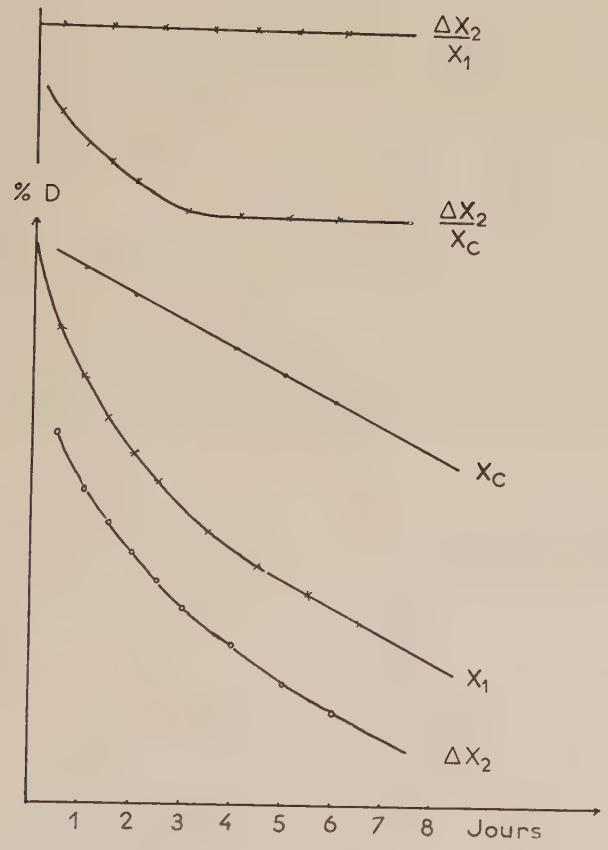

FIGURE 13 : Schéma représentant :

X_1 : courbe de l'activité plasmatique
X_c : courbe de l'activité retenue par le corps
ΔX_2 : courbe de l'activité excrétée quotidiennement

} exprimées en % de D injectée

$\frac{\Delta X_2}{X_1}$: activité excrétée quotidiennement exprimée par rapport à l'activité plasmatique moyenne du jour correspondant

$\frac{\Delta X_2}{X_c}$: activité excrétée quotidiennement exprimée par rapport à l'activité moyenne retenue par le corps du jour correspondant

Rappelons que l'on doit entendre compartiment intra-vasculaire au sens large. Il peut comprendre un espace même intra-cellulaire (par ex. les cellules parenchymateuses du foie) qui contiendrait les enzymes protéolytiques capables de dégrader la protéine. Ce milieu intra-cellulaire, pour rentrer dans la définition du compartiment intra-vasculaire, doit obéir à la seule condition d'être accessible aux protéines plasmatiques par des échanges très rapides. Cette hypothèse est actuellement admise, dans le cas de l'albumine, par la plupart des auteurs [4, 6, 47, 71].

Dans le cas de l'haptoglobine, il est impossible, par des expériences de cinétique, de mettre en évidence le lieu du catabolisme de cette protéine. Dans ce cas, l'argument de Mc FARLANE n'est plus applicable. En effet, l'état d'équilibre étant très vite atteint, après injection d'haptoglobine marquée, les taux d'excrétion urinaire, qu'ils soient exprimés en pourcentage de la radioactivité plasmatique ou de la radioactivité totale du corps, restent tous deux pratiquement constants dès le premier jour. Nous admettons cependant, jusqu'à preuve du contraire, que l'haptoglobine, comme les autres protéines plasmatiques (les γ-globulines exceptées) est catabolisée dans le compartiment iV.

CHAPITRE II

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I. — TECHNIQUE DE MARQUAGE PAR ^{131}I

Nous avons adopté la technique de Mac Farlane [52]. Elle consiste à fixer ^{131}I sur la molécule de Hp en présence d'iode entraîneur. L'iode est préparé à partir d'un mélange d'iodure et d'iodate qu'on acidifie ensuite.

Cette réaction s'écrit :

$$5\ KI + KIO_3 + 6\ HCl = 3\ I_2 + 6\ KCl + 3\ H_2O$$

On constate que l'iode est fixé essentiellement sur la tyrosine et en partie sur l'histidine.

A. — MODE OPÉRATOIRE

Dans un tube à essais, on dissout 50 mg de Hp dans 1 ml d'eau. On ajoute une goutte de tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M à pH 9. Dans un flacon contenant 50 mCi d'iodure ^{131}I, on introduit 0,1 ml de KI 5 M/200 et 0,1 ml de KIO_3 M/200. On ajoute ensuite 0,2 ml de HCl N pour libérer l'iode du mélange iodure-iodate.

La solution protéique est agitée mécaniquement pendant que l'on verse goutte à goutte l'iode dans la solution de Hp à l'aide d'un fin capillaire. On vérifie que le pH de la solution est encore alcalin.

On prolonge l'agitation quelques minutes, puis on laisse reposer le mélange pendant une demi-heure.

L'iode minéral non fixé par la protéine est réduit à l'état d'iodure par addition de quelques gouttes d'une solution d'hyposulfite de sodium N/100. Les iodures sont éliminés de la solution par passage

sur une colonne d'amberlite IRA 400 (Cl^-) équilibrée auparavant contre du sérum physiologique. L'élimination des iodures est achevée par dialyse de la solution contre du sérum physiologique pendant 24 à 48 heures, en changeant fréquemment le liquide.

B. — ANALYSE DES PRODUITS OBTENUS

1) Electrophorèse sur papier

Une partie aliquote de Hp marquée de Rat ou de Lapin est mélangée à un peu de plasma de Rat ou de Lapin selon le cas. Ce plasma enrichi en Hp est soumis à une électrophorèse sur papier en tampon Tris-EDTA pH 8,8 (60,5 g Tris, 6 g complexon II, 4,6 g acide borique, et eau distillée q.s.p. 1.000 ml).

Après révélation par l'amido-schwarz, les fractions sont découpées, déposées dans des tubes et comptées dans un appareil (Autogamma de Packard).

2) Dosage de l'iode fixé sur la protéine

Nous avons utilisé la méthode de Bird et Jackson [8]. Elle consiste à libérer l'iode fixé sur la protéine par digestion chloro-chromique et à le doser ensuite. Ce dosage repose sur l'action catalytique de l'iode vis-à-vis de la réaction de réduction des ions cériques en ions céreux sous l'influence de l'acide arsénieux. Cette réaction s'accompagne d'une décoloration dont l'intensité, inter alia, est proportionnelle à la quantité d'iode présent dans la solution.

En pratique, on prépare une gamme-étalon avec des solutions titrées d'iode, contenant de 0,02 à 0,06 μg d'iode par ml. On prépare également des solutions de la protéine iodée diluées de manière à obtenir des quantités de même ordre. Leur teneur en protéine est donnée par leur absorbance à 280 mμ. Après addition des réactifs, les mesures sont faites à 415 mμ. Les teneurs en iode des solutions protéiques sont déterminées d'après la courbe-étalon.

3) Passage sur DEAE-cellulose

La préparation de Hp marquée est chromatographiée sur DEAE-cellulose. La fixation se fait en tampon acétate 0,03 M à pH 5,1. Une première fraction de Hp est éluée grâce à un système d'élution

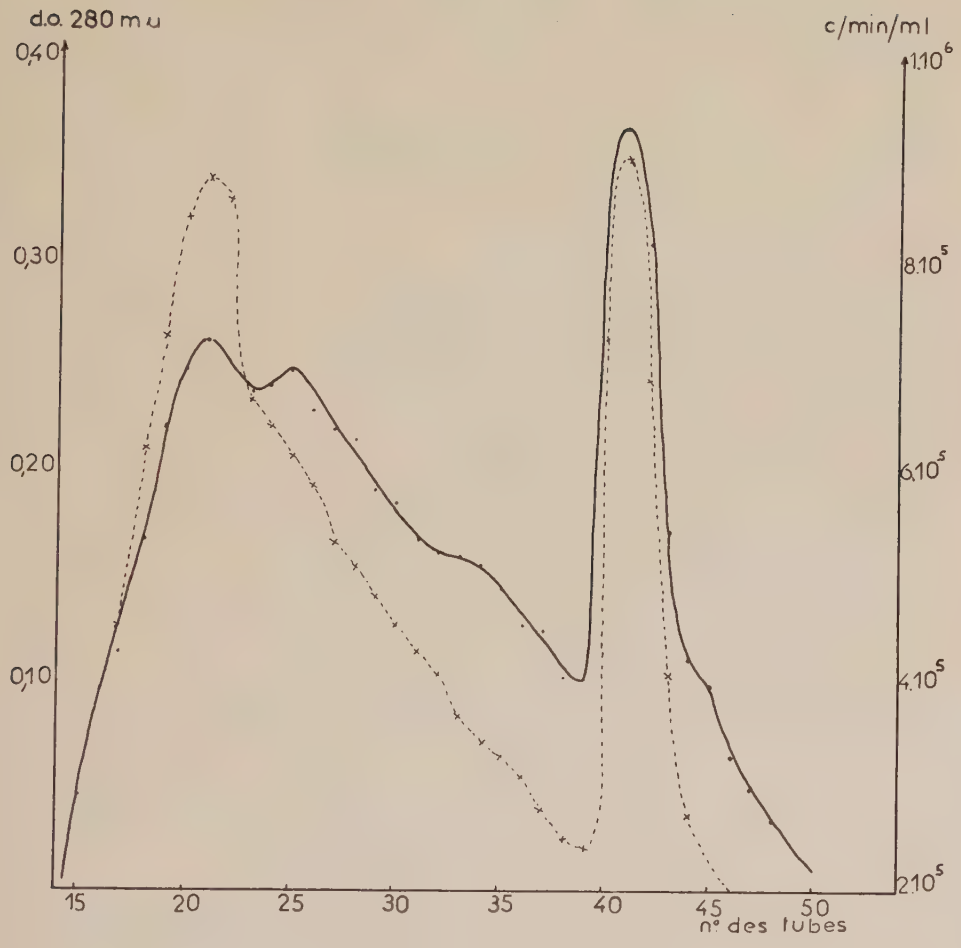

FIGURE 14 : Diagramme d'élution de ^{131}I Hp

Colonne de DEAE-cellulose
Tampon acétate à pH 5,1 de 0,03 M à 0,3 M par gradient linéaire
Tampon acétate M à pH 5,1
———— absorbance à 280 mμ
— — — radioactivité exprimée en c/mn/ml

présentant un gradient continu de concentration. La technique utilisée est la même que celle que nous avons décrite lors de la purification de Hp de Rat. La concentration du tampon éluant passe de 0,10 M à 0,30 M. Une dernière fraction est éluée par un tampon acétate M à pH 5,1.

C. — RÉSULTATS

1) Activité spécifique

La protéine iodée présente une activité de 100 μCi par mg environ.

— *Activité biologique :* après ioduration, un tiers du produit final a perdu la propriété de s'unir à l'hémoglobine.

2) Electrophorèse sur papier

Celle-ci montre que Hp marquée migre comme Hp native au niveau des α_2-globulines. Une très faible radioactivité est décelée au point de déposition.

3) Iode fixé sur la protéine

Dans les conditions que nous avons décrites plus haut, le nombre d'atomes d'iode fixés sur la protéine varie entre 0,4 et 0,6 par mole de Hp.

4) Passage sur DEAE-cellulose

La *figure 14* représente la courbe d'élution de Hp marquée. Les deux pics correspondent à deux fractions différentes de Hp, le premier à une Hp native, le second à une Hp dénaturée. Celle-ci constitue à peu près un tiers de la quantité initiale mise sur la colonne.

Le passage sur DEAE permet de séparer la partie dénaturée de la partie active de la protéine. Celle-ci cependant n'est pas marquée de façon homogène comme le montre la comparaison entre la courbe des concentrations et celle des radioactivités (*fig. 14*).

II. — EXPERIENCES SUR LES ANIMAUX

A. — ANIMAUX

Les lapins sont de la race Albinos et pèsent environ 4 kg.

Les rats sont des rats blancs de la souche Wistar.

1) Boisson

Trois jours avant l'injection de protéine marquée, les animaux reçoivent une eau de boisson contenant 0,02 % de KI et 0,45 % de NaCl. La thyroïde de l'animal étant saturée, l'élimination des iodures se trouve ainsi considérablement accélérée.

2) Cages

Les lapins sont mis dans des cages métalliques construites spécialement pour permettre une récolte facile et quantitative des urines. Les rats sont maintenus dans des bocaux de verre pourvus d'une mangeoire latérale et d'une partie inférieure conique permettant un écoulement rapide des urines.

3) Urines

Les urines sont recueillies dans des flacons contenant quelques grains de KI comme entraîneur.

B. — ADMINISTRATION DE Hp MARQUÉE

Les solutions de Hp ^{131}I que l'on injecte à un lapin par voie intra-veineuse contiennent 10 à 15 mg de Hp dont la radioactivité spécifique varie de 10 à 100 μCi/mg selon le type d'expérience. Les rats reçoivent en moyenne des solutions contenant 5 à 10 mg de Hp ayant la même radioactivité spécifique.

L'injection se fait chez le lapin dans la veine marginale de l'oreille tandis que pour le rat la solution est injectée dans la veine caudale.

Pour évaluer la radioactivité de la solution injectée, on effectue les comptages sur des quantités minimes, de l'ordre du dixième de ml. Lorsque la radioactivité de la solution présente une valeur trop élevée, une dilution s'impose. A cet effet, dans un ballon jaugé de 10 ml, on introduit 0,1 ou 0,2 ml de la solution, 5 ml de soude à 20 % et ensuite quelques gouttes d'une solution d'iodure de potassium. On complète ensuite à 10 ml avec de l'eau distillée. La protéine hydrolysée par la soude ne risque plus d'être adsorbée sur les parois du verre ; les iodures libérés se répartissent de façon égale dans la solution grâce à la présence d'iodure entraîneur.

Dans le but également d'éviter des pertes par adsorption sur les parois de verre, les seringues avec lesquelles on injecte la solution de protéine marquée doivent être enduites de silicone.

Prélèvement

Les prélèvements sont effectués chez le Lapin par ponction de la veine marginale, chez le Rat par ponction cardiaque. Celle-ci est préférable à la prise de sang effectuée après résection de la queue car, ainsi que nous l'avons indiqué dans la première partie de ce travail, cette opération provoque toujours une élévation du taux de Hp pendant les jours suivants, ce qui perturbe le métabolisme de l'animal.

Sur une partie du sang prélevé, on détermine l'hématocrite. Sur le reste, on isole le plasma des globules par centrifugation et on prélève une quantité exacte du surnageant (0,1 à 1 ml), que l'on dépose dans un tube et dont on mesure la radioactivité dans un appareil Auto-gamma de Packard. Pour chaque prise, la radioactivité du plasma est déterminée en c/mn/ml.

Le premier prélèvement a lieu 5 minutes après injection de la solution radioactive. Il sert à mesurer le volume plasmatique de l'animal.

Le dernier prélèvement a lieu 7 à 15 jours après l'injection.

C. — EXAMEN DES PLASMAS

1) Précipitation par l'acide trichloracétique

Pour déterminer la fraction de la radioactivité qui n'est pas liée aux protéines, on effectue sur les plasmas une précipitation par l'acide trichloracétique. A cet effet, on prélève 0,5 ml de plasma. On en mesure la radioactivité. On y ajoute 0,5 ml de sérum phy-

siologique, puis 1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 20 %. Après centrifugation, 0,5 ml du surnageant est prélevé et compté.

La radioactivité ainsi mesurée est multipliée par 4 et rapportée à la radioactivité totale de l'échantillon plasmatique initial.

2) Electrophorèse sur papier

Les électrophorèses sont faites sur chaque échantillon de plasma, soit dans un tampon Tris-EDTA à pH 8,8, soit en tampon véronal à pH 8,6.

3) Méthode d'isolement du complexe. Mesure de sa radioactivité spécifique

La méthode de séparation du complexe Hp-Hb par chromatographie fractionnée sur DEAE-cellulose a déjà été décrite dans la première partie de ce travail. Rappelons-en le principe.

En chromatographie sur DEAE-cellulose, le complexe Hb-Hp est élué par un tampon T_1 de molarité inférieure à celle du tampon T_2 qui élue Hp. On fixe le sérum sur la colonne en tampon 0,03 M. On lave avec T_1 jusqu'à ce qu'il n'entraîne plus de protéines. Puis on élue la fraction de Hp susceptible de se fixer sur Hb par une solution de Hb dans ce même tampon T_1. On entraîne un complexe Hp-Hb qui est pur en électrophorèse en gel d'amidon. On mesure sa radioactivité, son activité peroxydasique par la méthode de Jayle, sa concentration par spectrophotométrie. De ces mesures, on déduit sa radioactivité spécifique. Connaissant l'activité totale de la prise initiale fixée sur la colonne, on détermine la radioactivité liée à la fraction de Hp susceptible de former un complexe. Celle-ci est alors exprimée en pourcentage de la radioactivité totale de la prise initiale.

Ces mesures de radioactivité spécifique et totale de la partie complexable de Hp sérique sont effectuées sur chaque prélèvement sanguin et portées ensuite sur un graphique en fonction du temps. La courbe ainsi obtenue représente la cinétique de disparition du compartiment plasmatique de la fraction de Hp encore susceptible de s'unir à Hb.

D. — TECHNIQUE DU SCREENING

Malgré toutes les précautions prises, le marquage par l'iode n'est pas homogène et dénature toujours une partie de la protéine. Certaines molécules contiennent plus de 1 ou 2 atomes d'iode, d'autres

ont sans doute perdu en partie leur structure tertiaire puisqu'elles ne s'unissent plus à l'hémoglobine. La première fraction éluée de la colonne de DEAE-cellulose peut contenir des produits qui ne sont plus totalement « physiologiques ».

Mac Farlane [52] a proposé une méthode de purification que nous appelons « filtrage » (« screening »).

Elle consiste à injecter la protéine iodée à un premier animal qui, pendant 3 ou 4 jours, élimine les fractions dénaturées. L'animal est alors saigné à blanc. Son plasma ne contient plus que les protéines dites « physiologiques ».

On peut procéder de deux façons :

— ou bien injecter un certain volume de ce sang à un deuxième animal auquel on retire un volume égal de sang non marqué ;

— ou bien purifier sommairement la protéine marquée (par chromatographie sur DEAE-cellulose) et l'injecter sous un faible volume aux animaux en expérience.

CHAPITRE III

RESULTATS

I. — RESULTATS OBTENUS SUR LE LAPIN

La technique du « filtrage » que nous venons de décrire semble, à première vue, de loin la meilleure, puisque l'on confie à l'animal lui-même le soin de faire la discrimination entre molécules physiologiques et molécules dénaturées. Pourtant, cette technique présente des inconvénients qu'il nous faut signaler. Pour que le filtrage soit efficace, il faut le prolonger plusieurs jours ; si la protéine étudiée a une demi-vie assez longue, l'inconvénient est minime ; mais si son turn-over est rapide, elle s'élimine rapidement ; on risque donc de ne récupérer qu'une très faible radioactivité injectable au deuxième animal. De plus, avec le temps, des produits marqués du catabolisme de la protéine peuvent s'accumuler dans le sang ; il serait souhaitable, mais ce n'est pas toujours possible, de les en éliminer avant l'injection. Or, selon le mode de purification et de concentration adopté, on risque de dénaturer partiellement la protéine marquée.

Si l'on ne procède pas au tamisage par l'animal, on peut injecter une dose de radioactivité bien plus forte. L'élimination urinaire est, sans doute, perturbée pendant les premiers jours par l'excrétion des molécules dénaturées, mais on peut suivre le catabolisme bien plus longtemps. Si bien que chacune des deux techniques présente ses avantages et ses inconvénients : si le filtrage donne une meilleure analyse des phénomènes pour la première partie de l'expérience, l'autre méthode permet de suivre plus longtemps le devenir de la protéine marquée.

C'est pourquoi nous avons procédé à trois types d'expériences, conduites chaque fois sur plusieurs lapins :

— Premier type : injection directe de la protéine marquée.
— Deuxième type : expérience avec un filtrage de 2 jours.
— Troisième type : avec un filtrage plus prolongé, de 5 ou 6 jours.

Nous les décrirons successivement.

1) Premier type d'expérience : sans filtrage

60 mg de Hp de Lapin très purifiée sont marqués par 10 mCi d'iode dans les conditions décrites plus haut. La protéine contient 0,6 atome-gramme d'iode par mole de Hp. Après dialyse contre du sérum physiologique, la solution de protéine marquée est divisée en trois parties égales ; chacune est injectée à un lapin.

- Résultats :

Par électrophorèse sur papier, en tampon Tris-EDTA à pH 8,8, nous avons examiné les divers échantillons de sérum prélevés après le 8e jour, et comparé le résultat à celui que donne la protéine injectée.

La préparation de Hp marquée par ^{131}I présente une seule bande située au niveau des α_2-globulines. Elle contient 90 % de la radioactivité déposée. Le reste ne se déplace pas, il s'agit de protéine dénaturée.

Par contre, avec les sérums prélevés, on obtient deux bandes radioactives entre l'albumine et les β-globulines, une importante et une plus mince. En tampon acétate à pH 5,1, toute la radioactivité est au niveau des α_1-globulines.

A partir du sérum, la précipitation par l'acide trichloracétique qui ne détache pas l'iode fixé sur la protéine entraîne la quasi-totalité de la radioactivité. Le sérum contient moins de 1 % d'iodures radioactifs. On peut donc confondre l'activité du sérum et celle des protéines haptoglobiniques, qu'elles soient encore natives ou en cours de catabolisme.

Nous avons suivi la radioactivité plasmatique pendant 17 jours. Les résultats sont rassemblés sur la *figure 15*.

On constate que :

— les trois lapins se sont comportés de façon presque identique. Entre le 9e et le 17e jour, la courbe présente une partie rectiligne qui permet de calculer une demi-vie apparente de 4 ± 0,3 jours pour Hp ;

— pendant les premiers jours, la chute de la radioactivité plasmatique est très rapide. Le 8e jour, il ne reste plus que le centième de la dose initiale.

2) Deuxième type d'expérience : filtrage de 2 jours

Les expériences précédentes nous ont montré que, pendant les deux premiers jours, une grande partie des protéines dénaturées

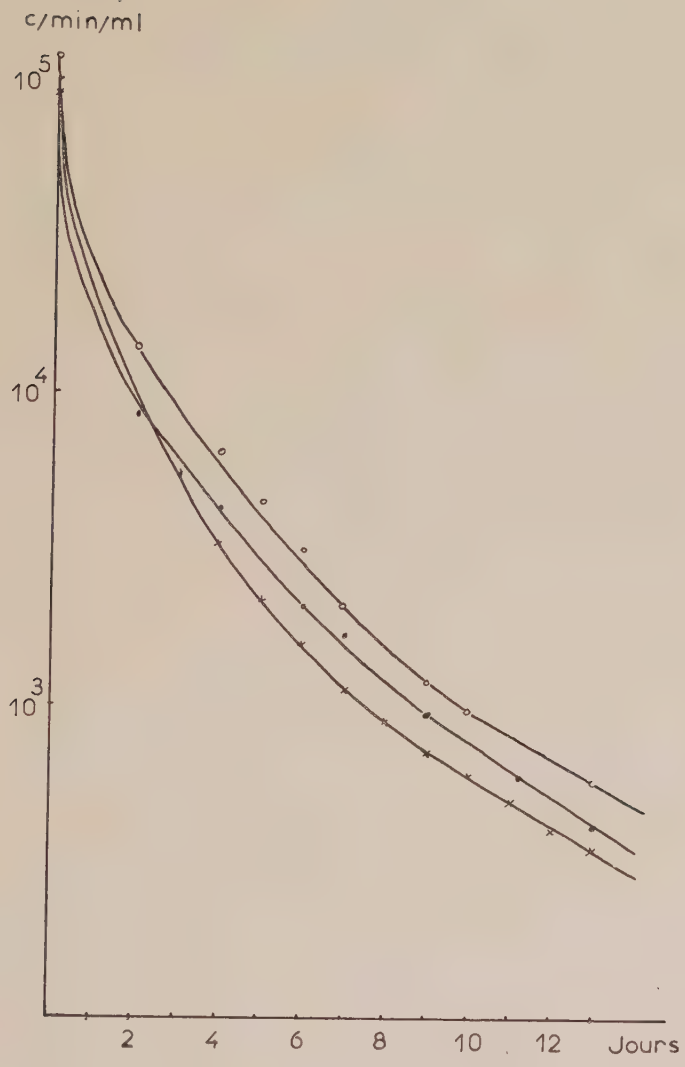

FIGURE 15 : Décroissance de la radioactivité plasmatique chez trois lapins après injection de ^{131}I Hp non « filtrée ». En ordonnées : coups/mn/ml

étaient catabolisées. C'est pourquoi, dans ce deuxième type d'expérience, nous avons procédé à un filtrage modéré, de deux jours seulement, capable d'éliminer une bonne partie des protéines dénaturées tout en laissant dans le plasma une radioactivité assez importante pour être suivie longtemps dans le deuxième animal receveur.

a) Protocole expérimental :

40 mg de Hp de lapin lyophilisée sont marqués par 20 mCi de ^{131}I en présence d'iode entraîneur : 1 atome d'iode est fixé pour 2 molécules de Hp.

Cette protéine marquée est injectée à un premier lapin qui est saigné 2 jours après. Le plasma est dialysé pendant 12 heures contre du tampon acétate 0,03 M à pH 5,1 et versé ensuite au haut d'une colonne de DEAE-cellulose équilibrée contre le même tampon. Après un bref lavage avec du tampon 0,03 M, Hp est éluée dans un petit volume (20 ml) par un tampon 0,20 M.

Cette solution contient 34 mg de Hp native ayant une radioactivité totale de 29 . 10^6 c/mn.

On injecte alors cette solution à un second lapin.

b) Résultats :

La *figure 16* représente :

A : La radioactivité du compartiment iV en % de D.

B : La radioactivité excrétée quotidiennement en % de D.

C : La radioactivité du corps total en % de D, obtenue par différence (100 % — U).

D : La radioactivité du compartiment EV en % de D (100 % — U — iV).

E : Le taux partiel d'excrétion urinaire k_{12} en % de la radioactivité iV.

F : L'activité de Hp susceptible de s'unir à Hb (exprimée en c/mn/0,1 mg).

c) Analyse des résultats :

1° La demi-vie apparente obtenue graphiquement à partir de la courbe A est de 3,75 jours.

Le temps d'équilibre vrai t_1 déterminé par le sommet de cette courbe est atteint 24 heures après l'injection. Le temps d'équilibre apparent t_2 (début de la portion linéaire de la courbe) ne commence qu'au bout du cinquième jour.

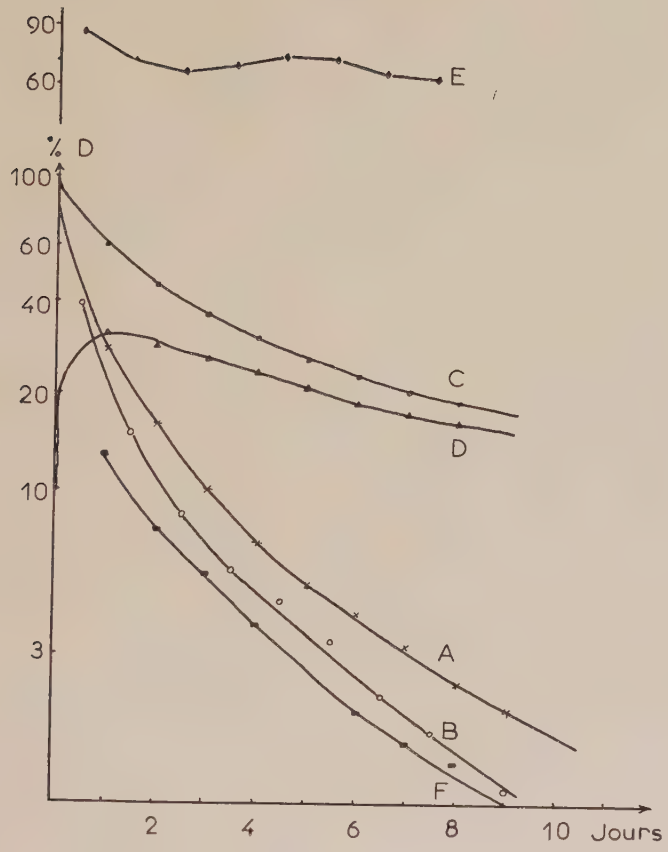

FIGURE 16 : Lapin ayant reçu une préparation de ^{131}I purifiée par un « filtrage » de 2 jours

A = Activité iV exprimée en % de D
B = Activité urinaire exprimée en % de D
C = Activité totale retenue par le corps exprimée en % de D
D = Activité EV exprimée en % de D
E = Taux partiel d'excrétion urinaire k_{12}
F = Activité de Hp susceptible de s'unir à Hb (exprimée en c/mn/0,1 mg)

2° La décroissance initiale de la radioactivité plasmatique (courbe A) est très rapide. 24 heures après l'injection, elle est passée de 100 à 28 %.

3° La radioactivité urinée au cours des 24 premières heures représente 40 % de la dose injectée (courbe B) et 87 % de la radioactivité plasmatique (courbe E). Le taux d'excrétion urinaire moyen est de 70 % de la radioactivité plasmatique.

d) Discussion :

1° La vitesse de catabolisme de la protéine marquée est très rapide, surtout dans les premiers jours, ce qui indique la présence d'une fraction encore importante de molécules dénaturées dans la préparation de Hp ^{131}I injectée au second animal receveur.

2° La courbe de radioactivité EV n'est pas parallèle à la courbe de radioactivité iV après le temps d'équilibre. Une partie de la radioactivité est donc retenue dans les espaces extra-vasculaires et ne participe plus aux échanges entre espaces iV et EV.

Cette constatation est à mettre en relation avec un autre fait expérimental. Deux jours après l'injection de Hp marquée et en partie dénaturée, nous avons décelé la présence d'une forte proportion d'iodures radioactifs au niveau de l'épiderme et des poils de l'animal. Cette diffusion des iodures au niveau des poils en vue de leur évacuation constituerait pour l'animal un autre moyen de les éliminer, surtout lorsqu'ils deviennent trop abondants dans le système vasculaire. Elle a été déjà signalée par quelques auteurs [55, 56, 84]. Les iodures passant du système EV dans les poils sont éliminés à une vitesse plus lente que les iodures présents dans le système iV le sont par les reins dans les urines. Ce passage de l'iode dans le pelage explique, pensons-nous, que la pente de la courbe de radioactivité EV soit plus faible que celle de la courbe de radioactivité iV.

e) Conclusion :

L'expérience a prouvé qu'en 2 jours de « filtrage », l'animal était incapable d'éliminer toutes les formes anormales de Hp dont le taux de catabolisme est supérieur à celui de Hp native.

Appendice

TAUX DE Hp NATIVE CIRCULANTE

Dans cette même série d'expériences, nous avons recherché si Hp circulant dans le plasma gardait la propriété de s'unir à Hb et dans quelle mesure.

Sur chaque prise quotidienne de plasma, nous avons isolé le complexe Hp-Hb et calculé son activité spécifique, sa radioactivité totale et rapporté celle-ci à la radioactivité de la prise initiale.

Résultats :

30 à 50 % de la radioactivité totale du plasma sont liés à Hp native susceptible de former un complexe Hp-Hb actif.

Cette fraction restant constante tout au long de l'expérience, il en résulte que Hp native est catabolisée à la même vitesse que la partie dénaturée circulant en même temps dans le sang. La courbe F de la *figure 16* décrit la vitesse de disparition de Hp native marquée dont le taux dans le sang est exprimé en pourcentage de la dose injectée.

Conclusion :

A côté de Hp native, circule donc dans le sang un produit marqué qui a perdu la propriété de former avec l'hémoglobine un complexe doué d'activité peroxydasique. Cette protéine garde cependant un caractère physiologique puisqu'elle disparaît de la circulation sanguine à la même vitesse que la protéine native. Il est donc justifié de faire les mesures de radioactivité aussi bien sur le plasma que sur Hp susceptible de fixer Hb.

3) Troisième type d'expérience : « filtrage » de 6 jours

L'expérience précédente nous apporte deux renseignements. Le premier est que deux jours ne suffisent pas à l'animal pour éliminer la majorité des protéines qu'il ne reconnaît pas comme natives. Nous avons donc résolu de porter à 5 ou 6 jours ce temps de tamisage biologique. Le deuxième renseignement n'est pas moins important. A côté de Hp marquée et native circulent des protéines en partie dénaturées. Nous avons donc tenté de les en séparer. Voici le protocole expérimental que nous avons adopté.

a) Protocole expérimental :

60 mg de Hp sont marqués en présence de 500 μg d'iode entraîneur par 30 mCi de ^{131}I selon le mode opératoire habituel. La solution débarrassée des iodures en excès est injectée à un lapin ; 5 jours après, celui-ci est sacrifié et le plasma est mis à dialyser contre du tampon acétate 0,03 M à pH 5,1.

Une chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose permet d'en éliminer une partie des β et des γ-globulines par un bref lavage avec du tampon acétate 0,03 M. On élue ensuite la protéine marquée en trois fractions avec trois tampons de molarités différentes :

— la première (Hp A) est éluée avec un tampon 0,08 M ;

— la seconde (Hp B) avec un tampon 0,15 M ;

— et enfin la troisième (Hp C) avec un tampon 0,20 M. Celui-ci entraîne également la céruloplasmine.

Ces trois fractions sont concentrées dans du carbowax, puis dialysées contre du sérum physiologique.

On obtient ainsi :

— Hp A { 25 ml ; 3 mg Hp active ; 250.000 c/mn
— Hp B { 5 ml ; 7 mg Hp active ; 1,1 million c/mn
— Hp C { 22 ml ; 1 million c/mn ; Hp dénaturée (de l'ordre de 7-10 mg)

Les solutions Hp A, Hp B, Hp C sont injectées à trois lapins, appelés respectivement L_A, L_B et L_C.

b) Résultats :

Pour chaque lapin, les courbes des *figures 17, 18, 19* représentent en coordonnées semi-logarithmiques :

A : la radioactivité intra-vasculaire exprimée en % de D.

B : la radioactivité urinaire exprimée en % de D.

C : la radioactivité totale retenue par le corps exprimée en % de D.

D : la radioactivité extra-vasculaire exprimée en % de D.

E : le taux partiel d'excrétion urinaire k_{12} en % de la radioactivité iV.

F : le taux d'excrétion urinaire k_u en % de la radioactivité totale.

Aux données expérimentales, nous avons appliqué les différentes méthodes exposées au chapitre premier pour calculer le taux de catabolisme ainsi que le rapport de distribution EV/iV. Les résultats sont rassemblés dans le *Tableau V*.

k_{12}, le taux partiel de catabolisme iV, a été obtenu par deux méthodes différentes : la méthode d'analyse compartimentale et la méthode de la « clearance ».

Le rapport de distribution a été calculé par quatre méthodes différentes, à savoir :

— à partir des valeurs des constantes k_{13} et k_{31} ;

— la méthode du temps d'équilibre ;

— la méthode de distribution des activités ;

— et la méthode d'extrapolation de Berson.

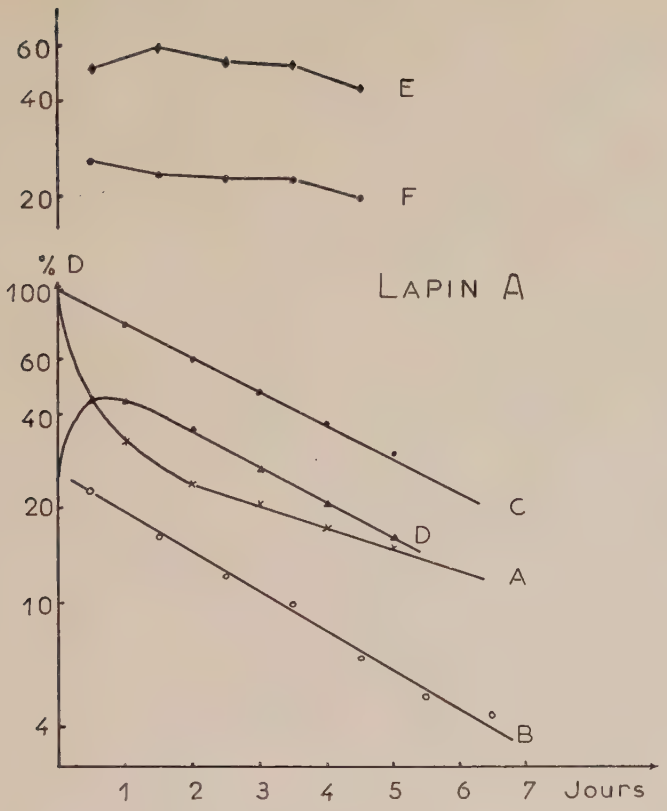

FIGURE 17 : Lapin A ayant reçu une préparation de ^{131}I Hp purifiée par un « filtrage » de 6 jours

A = Activité iV exprimée en % de D
B = Activité urinaire exprimée en % de D
C = Activité retenue par le corps exprimée en % de D
D = Activité EV exprimée en % de D
E = Taux partiel d'excrétion urinaire k_{12} exprimée en % de l'activité iV
F = Taux d'excrétion urinaire exprimé en % de l'activité totale du corps

La récupération urinaire, calculée par la formule de LEWALLEN * pour un temps infini, est exprimée en pourcentage de D.

(*) LEWALLEN [48] a proposé une formule qui permet de calculer la valeur vers laquelle tend asymptotiquement la courbe cumulative des urines.

Si $Q_{U\,cum}\ (\infty)$ = radioactivité urinaire exprimée en pourcentage de D au temps $t = \infty$.

$Q_{U\,cum}\ (t_1)$ = radioactivité urinaire cumulative au temps t_1.

$\frac{dQ_U\ (t_1)}{dt}$ = radioactivité urinaire excrétée au cours des 24 heures précédant t_1.

b = pente de la courbe d'excrétion urinaire après le temps d'équilibre, on a :

$$Q_{U\,cum}\ (\infty) = Q_{U\,cum}\ (t_1) + \frac{dQ_U\ (t_1)}{dt} \cdot \frac{1}{b}$$

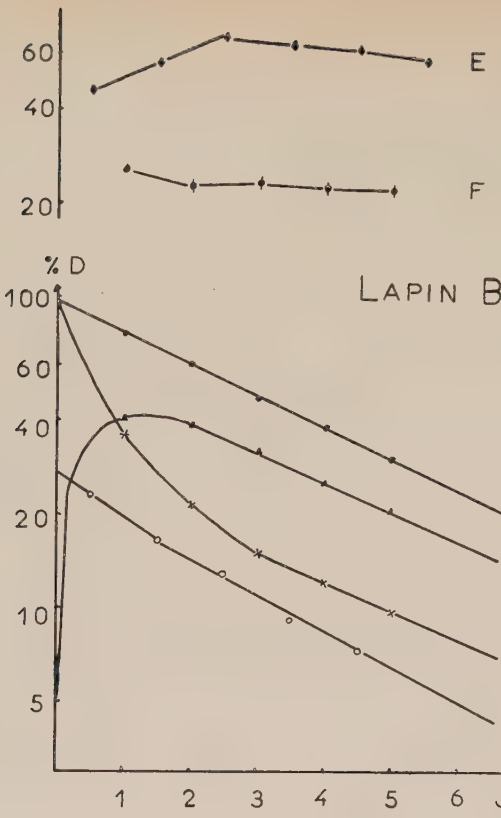

FIG. 18 : Lapin B. Même légende que celle de la *figure 17*

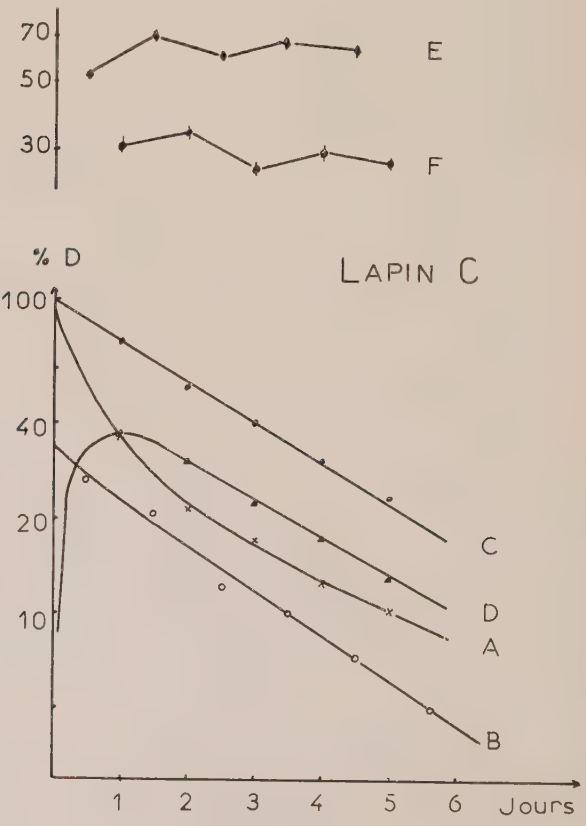

FIG. 19 : Lapin C. Même légende que celle de la *figure 17*

TABLEAU V

	L_A	L_B	L_C
Poids	3,900 kg	4,100 kg	4,600 kg
Volume plasmatique	150 ml	151 ml	153 ml
Demi-vie apparente	4 j	3,5 j	3 j
Taux de catabolisme apparents :			
k_a	17 %	20 %	23 %
k_u	23 %	23 %	27,5 %
Taux partiel de catabolisme iV :			
Méth. d'anal. compartimentale	45 %	54 %	54 %
Méth. de la clearance	51,5 %	57 %	59 %
Rapport de distribution EV/iV :			
Rapport des constantes k_{13}/k_{31}	1,15	1,35	1,00
Méth. du temps d'équilibre	1,35	1,15	1,05
Méth. de distribution des activités	1,80	1,80	1,50
Méth. d'extrapolation de Berson	—	2,00	1,30
Récupération urinaire :	88,6 %	95 %	104 %

c) DISCUSSION :

1) Trois faits permettent d'affirmer que, pour L_A et L_B, la préparation de Hp marquée est constituée par un lot de molécules physiologiques. Ce sont :

— une chute initiale de la radioactivité plasmatique peu accentuée ;

— un taux d'excrétion urinaire peu élevé dans les premiers jours ;

— et un temps d'équilibre apparent très vite atteint.

2) Les demi-vies apparentes des différents lots de Hp n'accusent que de légères différences entre elles :

— pour A : 4 jours ;

— pour B : 3,5 jours ;

— pour C : 3 jours.

3) Dans la méthode dite du temps d'équilibre, le temps d'équilibre vrai est déterminé par le maximum de la courbe d'activité extravasculaire. Par ce moyen, il est difficile de savoir si l'équilibre est atteint 12 ou 24 heures après injection ; la courbe de l'activité extravasculaire présente, en effet, une forme très arrondie, ce qui rend la position du sommet difficile à localiser. Pour en décider, nous avons procédé autrement.

On sait que la valeur du taux relatif de catabolisme k_{iV} est égale à la valeur de la pente de la tangente menée à la courbe d'activité plasmatique en un point t_1 = temps d'équilibre vrai. Connaissant le taux de catabolisme iV, on cherche sur la courbe de l'activité plasmatique le point pour lequel la pente de la tangente a la valeur de ce taux.

Par cette méthode, on trouve t_1 de l'ordre de 24 heures.

4) Pour les trois expériences, l'allure des courbes obtenues n'est pas la même. Pour L_B et L_C, les courbes des radioactivités plasmatique et extra-vasculaire sont parallèles, tandis qu'elles ne le sont pas pour L_A. D'autre part, L_B est le seul à présenter un ensemble de courbes parallèles après le temps d'équilibre.

En ce qui concerne L_A, la convergence des courbes d'activité plasmatique et extra-vasculaire peut s'expliquer par un transfert « non compensé » de protéines marquées du compartiment EV vers l'iV. Ce transfert a pour conséquence de rompre l'équilibre isotopique établi. Le rapport de distribution des activités EV/iV diminue au lieu de rester constant. S'il en est bien ainsi, ce transfert doit pouvoir être détecté sur la courbe de distribution (*fig. 20*). Pour les lapins L_B et L_C, les courbes de distribution présentent une allure normale. Après une chute initiale due à la diffusion précédant l'état d'équilibre isotopique, la courbe de distribution devient horizontale après le temps d'équilibre apparent. Au contraire, pour L_A, la courbe de distribution présente une concavité anormale. Après t_2, le sens de la diffusion s'inverse et le rapport de distribution des activités EV/iV diminue.

Les courbes de l'excrétion urinaire et de l'activité plasmatique n'ont pas des pentes identiques chez L_A et L_C. Plusieurs causes peuvent être invoquées pour expliquer ce fait. Pour L_A, le phénomène peut trouver son explication en tout ou en partie dans le transfert de protéines marquées du compartiment EV dans l'iV. Mais d'autres causes peuvent être intervenues.

a) Dans la théorie à plusieurs compartiments que nous avons adoptée, on suppose que l'excrétion des produits marqués est immédiate. Cette règle, confirmée par l'expérience, n'est cependant pas absolue. L'animal peut, pour diverses raisons, ne pas excréter entièrement et immédiatement les produits de dégradation de la protéine marquée. Ce retard entraîne des variations plus ou moins importantes du taux d'excrétion urinaire k_u, variations qui affectent à leur tour la pente de la courbe d'excrétion urinaire. On constate, en effet, que les fluctuations du taux d'excrétion urinaire k_u sont beaucoup plus importantes pour L_C que pour L_B.

b) Une autre raison pourrait avoir influencé l'allure générale des courbes représentant les activités plasmatique et urinaire. L'animal pourrait avoir perdu l'état d'équilibre métabolique.

Deux cas peuvent se produire :

— *Premier cas :* si la vitesse de synthèse augmente, les molécules néosynthétisées diluent les molécules marquées et la radioactivité spécifique de la protéine plasmatique diminue. La pente de la courbe de la radioactivité spécifique sera plus grande et on conclura à tort à une demi-vie plus courte.

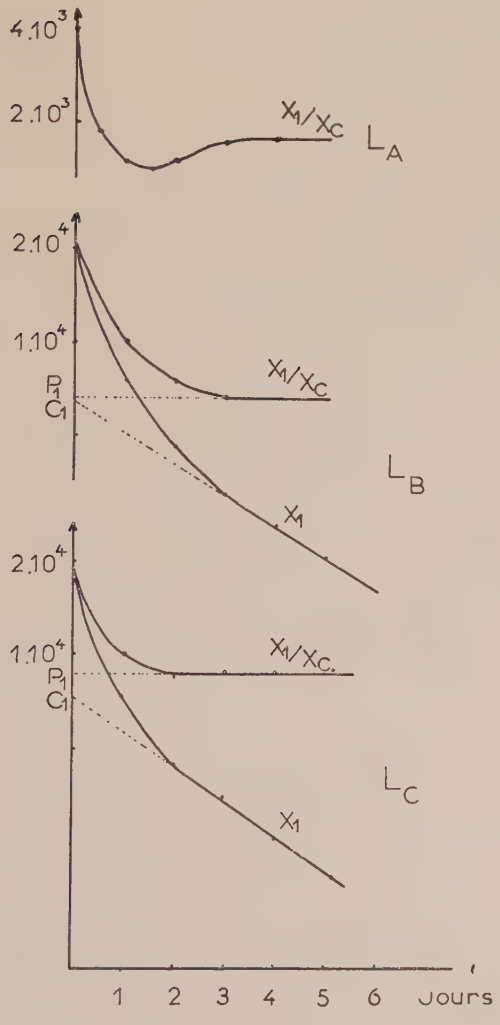

FIGURE 20 :

X_1/X_c : Courbes de distribution pour les Lapins A, B et C.

X_1 : Courbes de l'activité plasmatique pour les Lapins B et C.

Si, au contraire, la vitesse de synthèse diminue, la radioactivité spécifique sera plus grande et on aboutira à la conclusion inverse de la précédente.

Ces deux variations n'influent pas sur la courbe de radioactivité plasmatique dans laquelle la radioactivité est rapportée au poids des protéines totales. En effet, Hp représente à peine 1 % de la totalité des protéines et une augmentation, même très importante, de son taux ne modifie que très faiblement la concentration des protéines plasmatiques.

— *Deuxième cas :* dans le paragraphe précédent, nous avons supposé que la vitesse de catabolisme restait inchangée.

Supposons maintenant que la vitesse de synthèse soit constante. Si le catabolisme augmente, la courbe d'excrétion urinaire reflètera cette élévation beaucoup plus que la courbe de radioactivité plasmatique.

En fait, ce cas n'est pas à envisager pour la protéine « native ». En général, le taux de catabolisme reste constant. Friedberg [31] a, effet, constaté que des doses massives d'albumine injectées à des souris ne modifiaient guère le taux partiel de catabolisme de cette protéine. Regoeczi et Mc Farlane [71 *bis*] ont de même pu observer que le taux de catabolisme du fibrinogène était indépendant de la concentration de cette protéine dans le plasma.

c) Une autre explication peut également être proposée. Hp injectée au Lapin L_C est un mélange de protéines en partie dénaturées. Les unes seront donc éliminées plus rapidement que les autres. Les molécules à demi-vie courte affectent davantage la courbe d'excrétion urinaire, surtout dans sa partie initiale, que la courbe de l'activité plasmatique.

Effectivement, la radioactivité urinée pendant les deux premiers jours est plus importante pour L_C que pour L_A et L_B. Elle est de 47 % chez L_C alors qu'elle atteint 39 % chez L_A et chez L_B. De même, la courbe de l'excrétion urinaire accuse une pente initiale de 30 % pour L_C alors qu'elle n'est que de 23 % pour L_A et chez L_B. Par contre, les deux lapins L_B et L_C ont des k_a voisins : 20 % pour L_B et 23 % pour L_C.

Pour estimer le degré d'hétérogénéité d'une préparation de protéine marquée injectée, Berson [5] a proposé la méthode suivante :

On trace en coordonnées semi-logarithmiques la courbe de radioactivité plasmatique (exprimée en c/mn/ml en fonction du temps). La partie linéaire prolongée coupe l'axe des ordonnées en C_1. On trace également la courbe de distribution dont les points s'obtien-

nent en divisant l'activité plasmatique (en c/mn/ml) par la radioactivité retenue par le corps (exprimée en pourcentage de D).

Une fois la diffusion terminée, la courbe de distribution devient une horizontale qui, prolongée, coupe l'axe des ordonnées en P_1 (*fig. 20*).

La valeur de P_1 représente celle qu'aurait eu la radioactivité initiale du compartiment plasmatique si la diffusion avait été instantanée. La valeur C_1 représente celle qu'aurait eu la radioactivité initiale des molécules « à demi-vie longue » si la dégradation des molécules « à vie courte » et la « diffusion » avaient été immédiates.

Le rapport C_1/P_1 donne le pourcentage des molécules à demi-vie longue présentes dans la solution injectée :

— pour L_B, on a $C_1/P_1 = 97\ \%$;
— pour L_C, on a $C_1/P_1 = 87\ \%$.

On conclut donc à l'hétérogénéité de Hp C.

5) Dans la deuxième expérience, nous avions comparé entre elles les courbes de la radioactivité plasmatique d'une part et celle de la fraction de Hp susceptible de s'unir à Hb chez le même lapin. Comme les courbes étaient parallèles, nous en avions conclu que les deux fractions de Hp, la fraction native et celle qui ne l'est plus étaient dégradées à la même vitesse.

Dans cette troisième expérience, nous avons repris l'étude de la dégradation de ces deux Hp mais, cette fois, nous avons comparé leur comportement sur deux animaux différents et en tenant compte des renseignements donnés par les radioactivités urinaires. Nous constatons, en effet, que malgré des demi-vies plasmatiques voisines, les taux d'excrétion urinaire, surtout dans les premiers jours, accusent des différences sensibles. D'autre part, un examen approfondi de la courbe de l'activité plasmatique initiale met en évidence la composition hétérogène de l'haptoglobine C.

Les résultats de cette troisième expérience nous amènent donc à modifier les conclusions que nous avons avancées à la fin de la deuxième expérience. Nous avons maintenant la preuve que la fraction Hp C n'a pas une composition homogène. Elle comprend, à côté de molécules ayant une demi-vie comparable à celle de Hp native, une catégorie de molécules qui sont catabolisées et éliminées dans les urines plus rapidement que Hp native.

Cette conclusion n'a rien de surprenant, car les molécules en partie dénaturées doivent s'éliminer plus rapidement que celles dont le catabolisme n'a pas encore commencé.

6) *Choix des méthodes :* nous pouvons considérer Hp A et Hp B comme deux fractions natives. Mais des deux lapins A et B, seul ce dernier, ainsi que nous l'avons constaté, a conservé l'état d'équilibre. Seul il est donc justiciable des méthodes de calcul qui admettent, comme condition préalable, l'état d'équilibre. Pour le Lapin A, comme le déséquilibre provient d'un transfert du compartiment plasmatique vers le compartiment extra-vasculaire, on ne peut faire appel aux données plasmatiques seules pour calculer le taux de catabolisme. Sont valables dans ce cas les méthodes basées sur les radioactivités urinaires et en particulier la méthode de la « clearance ».

Par contre, dans le cas du Lapin C, la méthode de la « clearance » reste sujette à caution puisqu'elle mesure le taux de catabolisme à partir des données urinaires et nous savons que les molécules en partie dénaturées affectent davantage la courbe d'excrétion urinaire que la courbe d'activité plasmatique.

Pour calculer le rapport de distribution, nous avions le choix entre deux méthodes : le rapport des constantes de diffusion déterminées par l'analyse compartimentale et la méthode du temps d'équilibre.

La méthode de distribution des activités à laquelle se ramènent les méthodes d'extrapolation de STERLING et BERSON, ne peut être retenue. Ces méthodes admettent une erreur trop considérable. En effet, les valeurs respectives des constantes de diffusion k_{13} et k_{31} sont égales à $\approx$ 0,75 et 0,65 j^{-1}. — b_1 étant égal à 0,20 j^{-1}, le rapport de distribution calculé selon cette méthode d'après la formule $\frac{k_{13}}{k_{31} - b_1}$ présente donc une valeur une fois et demie trop élevée.

En résumé, chez le Lapin, Hp a un taux partiel de catabolisme iV de 54 % (± 5 %). Son rapport de distribution EV/iV est égal à 1,1-1,2. La valeur absolue du taux de catabolisme est de 2 à 10 mg/jour/kg d'animal.

II. — RESULTATS OBTENUS SUR LE RAT

1) Première étape

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la demi-vie apparente de l'haptoglobine ^{131}I plasmatique uniquement d'après la deuxième partie de la courbe de l'activité plasmatique.

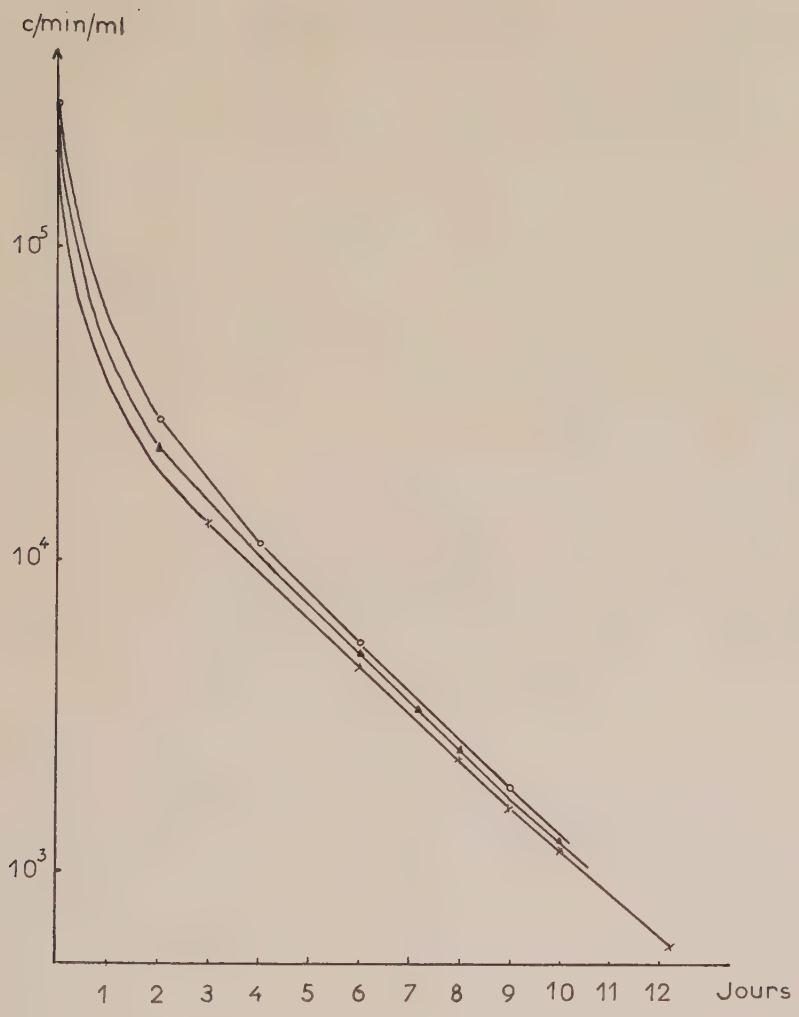

FIGURE 21 : Décroissance de l'activité plasmatique chez trois rats après injection de ^{131}I Hp non « filtrée ». En ordonnées : coups/mn/ml

a) PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL :

30 mg de Hp sont marqués par 7 mCi de ^{131}I en présence de 0,4 mg d'iode entraîneur. La solution de Hp marquée, après dialyse, contient 18 mg de Hp native ayant une radioactivité totale de 17 millions de c/mn.

Trois rats ont reçu chacun par voie intra-veineuse un tiers de cette solution.

Les prises de sang sont faites à intervalles réguliers.

b) Résultats :

Les radioactivités plasmatiques exprimées en c/mn/ml sont rapportées sur un graphique en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps (*fig. 21*).

Pour les trois rats, la demi-vie apparente est de 2 ± 0,2 jours. Dans les jours qui suivent l'injection, la radioactivité plasmatique chute brutalement ; elle passe de 100 à 10 en deux jours.

Pour étudier la courbe d'activité plasmatique dans son début, il faut recourir au « filtrage ».

2) Deuxième étape

Dans une deuxième étape, nous avons injecté à trois rats une préparation de Hp ^{131}I purifiée après « filtrage ». Pour chacun des rats, nous avons opéré de la façon suivante :

a) Protocole expérimental :

25 mg de Hp sont iodés par 20 mCi de ^{131}I en présence de 0,190 mg d'iode entraîneur. Après élimination des iodures, cette solution est injectée à deux rats. Au bout de trois jours, les deux rats sont saignés et le plasma dialysé contre un tampon acétate 0,03 M. Le plasma est ensuite fixé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée contre le même tampon. Un lavage avec un tampon acétate 0,06 M élimine une partie des protéines ainsi qu'une fraction de Hp radioactive. Hp native est alors éluée avec un tampon acétate 0,12 M. Celle-ci, après concentration dans du carbowax, est contenue dans un volume de 8 ml ayant une radioactivité totale de 4.100.000 c/mn.

Les prélèvements de sang et la récolte des urines sont effectués quotidiennement et sont interrompus lorsque les radioactivités plasmatiques sont devenues inférieures à une valeur limite déterminée par la sensibilité de l'appareil de comptage. Nous avons suivi la radioactivité plasmatique pendant 7 jours chez les trois rats. Le 7^{e} jour, 0,1 ml de plasma donnait encore 500 c/mn environ.

b) Résultats :

Les courbes de radioactivité plasmatique, extra-vasculaire, urinaire et de la radioactivité retenue par le corps sont rapportées

en coordonnées semi-logarthmiques en fonction du temps sur le graphique (*fig. 22*).

Les données numériques relatives au volume plasmatique, aux taux de catabolisme ainsi qu'au rapport de distribution EV/iV sont consignés dans le *Tableau VI*.

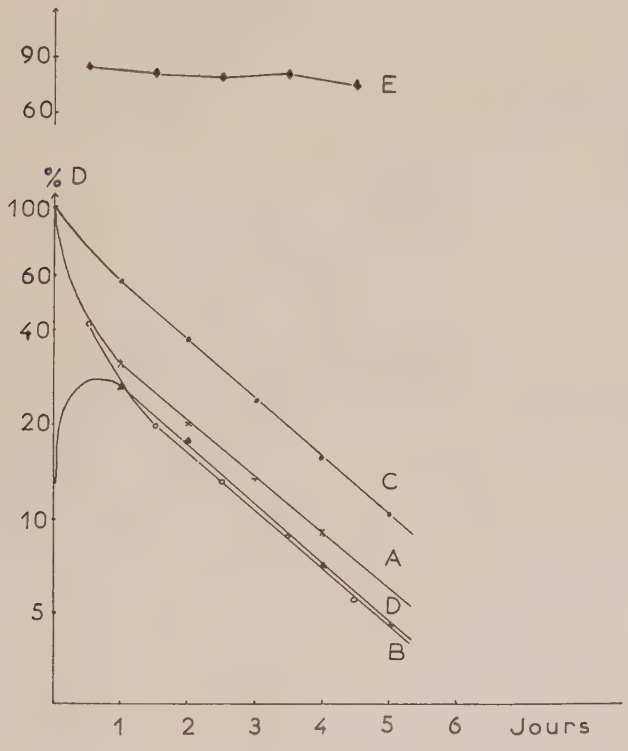

FIGURE 22 : Rat ayant reçu une préparation de ^{131}I Hp purifiée par un « filtrage » de trois jours

A = Activité iV exprimée en % de D
B = Activité excrétée exprimée en % de D
C = Activité retenue par le corps exprimée en % de D
D = Activité EV exprimée en % de D
E = Taux partiel d'excrétion urinaire k_{12}

k_{12}, le taux partiel de catabolisme IV, a été déterminé par deux méthodes différentes : la méthode d'analyse compartimentale et la méthode de la « clearance ». Pour calculer le rapport de distribution,

nous avons utilisé la méthode d'analyse compartimentale (rapport des constantes k_{13}/k_{31}), celle du temps d'équilibre et celle de distribution des activités. Cette dernière, rappelons-le, fixe une valeur limite supérieure de ce rapport.

TABLEAU VI : *Rat n° 3*

Poids	240 g
Volume plasmatique	21 ml
Demi-vie apparente	1,8 j (± 0,2 j)
Taux de catabolisme apparents	
k_a	38,5 %
k_u	42 %
Taux partiel de catabolisme iV :	
Méth. d'anal. compartimentale	77 %
Méth. de la « clearance »	78 %
k_{iV} moyen	77,5 %
Rapport de distribution EV/iV :	
Rapport des constantes k_{13}/k_{31}	0,7
Méth. du temps d'équilibre	0,75-0,80
Méth. de distribution des activités	1,0
Valeur absolue du taux de catabolisme :	1 à 3 mg/jour/100 g
Récupération urinaire :	101 %

c) DISCUSSION :

1) Après « filtrage », la demi-vie apparente reste inchangée ; elle est de 2 jours (± 0,2); la courbe de l'activité plasmatique présente initialement une décroissance relativement faible pendant la période de diffusion. Le taux d'excrétion urinaire reste pratiquement constant dès le premier jour. Le temps d'équilibre isotopique est très rapidement atteint (t_2 = 24 h). Ces trois faits permettent d'affirmer que l'animal a catabolisé une protéine marquée parfaitement physiologique. Il n'est donc pas nécessaire chez le Rat de prolonger la durée du « filtrage » au-delà de trois jours.

2) La tangente à la courbe de l'activité plasmatique présente une pente égale à 0,75 pour t = 18 h. Le temps d'équilibre vrai t_1 a donc une valeur de l'ordre de 18 h.

3) La valeur du rapport de distribution EV/iV est inférieure à celle que l'on trouve chez le Lapin. Par le rapport des constantes k_{13}/k_{31}, on obtient une valeur minimale de 0,70 et une valeur maxi-

male de 1,0 par la méthode de distribution des activités. La méthode du temps d'équilibre donne une valeur moyenne de 0,75-0,80.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux que MATTHEWS [58] a obtenus pour l'albumine ^{131}I injectée à 4 rats. Au temps d'équilibre, elle obtient pour le rapport EV/iV une valeur de 0,81, tandis que la méthode de distribution des activités donne une valeur de 1,25 pour le même rapport.

4) Les courbes de l'activité plasmatique, de la radioactivité retenue par le corps, de la radioactivité du compartiment EV et de l'excrétion urinaire sont parallèles : l'animal a donc gardé l'état d'équilibre.

III. — PRODUITS DU CATABOLISME

Des travaux récents [48, 55, 91] ont signalé que, après injection d'albumine ^{131}I à un animal, la presque totalité de la radioactivité était ensuite excrétée sous forme d'iodures. Les proportions varient suivant les auteurs entre 90 et 98 %.

Nous avons recherché également la forme d'excrétion de la radioactivité après injection de Hp ^{131}I et dans quelle proportion celle-ci était liée, soit aux iodures, soit à une combinaison organique. Ce travail a été fait chez l'Homme [11]. Nous l'avons refait chez le Lapin et le Rat.

a) TECHNIQUE :

Sur une fraction de l'urine, nous avons opéré une dialyse prolongée pendant 4 à 5 jours en renouvelant l'eau de dialyse toutes les 12 heures. La radioactivité de la fraction adialysable est ensuite déterminée et rapportée à la radioactivité de la prise initiale.

Pour déterminer le taux d'iode organique présent dans les urines, nous avons eu recours à la chromatographie sur résine Amberlite échangeuse de cations IRC 120.

Si on laisse filtrer de l'urine à travers une colonne de résine IRC 120, l'iode organique présent dans l'urine est fixé par les groupements sulfonés de la résine tandis que les iodures passent librement dans l'effluent.

Le lavage de la colonne avec de l'eau distillée entraîne les iodures alors que l'iode organique est ensuite élué avec une solution de NH_4OH 2 N.

Nous avons ensuite fait une analyse chromatographique de cet iode organique extrait par le butanol acide d'une partie aliquote de l'urine excrétée dans le premier jour.

Le résidu, après extraction et concentration, est soumis à une chromatographie sur papier dans le solvant butanol : acide acétique : eau (78 : 5 : 17).

b) Résultats :

Chez le Rat, la presque totalité de la radioactivité passe dans les eaux de dialyse. 0,2 % seulement de la radioactivité est fixé sur l'adialysable.

99 % de la radioactivité urinaire sont liés aux iodures et 1 % seulement à la fraction organique.

La chromatographie sur papier de cette fraction révèle la présence de trois dérivés phénoliques radioactifs qui ne sont ni la mono-, ni la di-iodo-tyrosine, mais qui en sont probablement des dérivés tels que l'acide 4 hydroxy 3-iodo-phénylpyruvique et l'acide 4 hydroxy-3-5-diiodo-phénylpyruvique (33, 49).

Chez le Lapin, nous avons pu vérifier également après injection de Hp^{3}H que l'animal catabolisait très rapidement la protéine sous forme d'acides aminés et d'eau tritiée. Ces deux formes d'excrétion représentent à elles seules 95 à 98 % de la radioactivité injectée tandis que les peptides non dialysables atteignent une proportion de 3 à 5 %.

On peut donc conclure que, chez le Rat et le Lapin, comme chez l'Homme d'ailleurs, Hp, qu'elle soit iodée ou tritiée, est très rapidement hydrolysée. Les acides aminés libérés peuvent suivre ensuite divers cycles de transformation. En particulier, la mono- et la di-iodo-tyrosine issues du catabolisme de Hp^{131}I se convertissent rapidement chez le Rat en des acides phénoliques iodés qui, à leur tour dégradés, libèrent l'iode sous forme d'iodures.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

L'étude du catabolisme de Hp^{131}I nous montre une fois de plus que Hp est une protéine fragile très sensible aux agents physiques et chimiques. Etant donné sa fragilité, on est obligé de prendre certaines précautions lorsqu'on utilise Hp^{131}I pour l'étude de son

métabolisme. Il ne faut pas que la fixation d'iode sur la protéine dépasse un atome pour deux molécules ; de plus, il faut recourir au tamisage biologique pour obtenir une Hp native.

Au cours du tamisage, nous avons pu mettre en évidence que Hp circulant dans le plasma avait perdu en grande partie son pouvoir de former avec l'hémoglobine un complexe doué d'activité peroxydasique. Nous avons constaté que cette fraction de Hp disparaissait de la circulation sanguine un peu plus vite que Hp native.

L'haptoglobine native présente un taux de catabolisme iV élevé : 54 % pour Hp de Lapin et 78 % pour Hp de Rat. Celui de l'albumine n'est que de 20 % chez le Lapin et de 60 % chez le Rat (54).

Le rapport de distribution de Hp entre les espaces intra- et extra-vasculaires est différent pour les deux espèces animales : il est de 1,1-1,2 chez le Lapin tandis qu'il n'est que de 0,75 chez le Rat.

RESUME ET CONCLUSIONS

Le but de ce travail était de préparer les Hp de Lapin et de Rat afin d'en étudier le catabolisme.

PREMIÈRE PARTIE

Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines de Lapin et de Rat

Nous avons d'abord préparé les haptoglobines de Lapin et de Rat à partir du sérum de ces animaux. Celui de Lapin contient 4 α_2-globulines. Le sérum de Rat en contient 7. La présence de ces protéines voisines de l'haptoglobine par leurs propriétés physiques en a rendu l'isolement d'autant plus difficile.

L'haptoglobine de Lapin s'obtient par deux chromatographies successives sur DEAE-cellulose. Par contre, l'obtention de l'haptoglobine de Rat nécessite trois chromatographies successives sur DEAE-, TEAE- et CMC-cellulose. Dans les deux cas, nous avons obtenu une protéine pure au regard de l'électrophorèse en gel d'amidon, de l'ultracentrifugation analytique et de l'électrophorèse en veine liquide, résultat qui jusqu'ici n'a jamais été obtenu.

Nous avons déterminé les principales constantes physiques de ces deux protéines. Le poids moléculaire a été obtenu à l'aide de deux méthodes différentes : l'ultracentrifugation (méthode d'Archibald) et la diffusion de la lumière (méthode de Putzeys).

Nous avons également établi les valeurs du coefficient d'absorbance, du point isoélectrique, et du coefficient de sédimentation $S°_{20,w}$. Nous avons trouvé :

	Lapin	*Rat*
Poids moléculaire	74.000	60.000
pHi	3,85	4,45
$S°_{20,w}$	4,0-4,1	3,65
$\varepsilon \frac{1 \text{ mg/ml}}{280 \text{ m}\mu}$	1,18	1,20

Nous avons déterminé la constitution chimique des haptoglobines de Lapin et de Rat. La composition en acides aminés a été obtenue grâce à un auto-analyseur. Les constituants glucidiques de ces deux glycoprotéines sont identiques mais leurs taux diffèrent. Ils ont été dosés directement sur ces protéines.

Des constantes physiques aussi bien que de la constitution chimique, il résulte que les haptoglobines de Lapin et de Rat sont différentes et que celle de Lapin se rapproche plus de Hp 1-1 humaine que Hp de Rat.

Comme Hp 1-1 humaine, ces deux glycoprotéines s'unissent aux hémoglobines animales. Nous avons établi la constitution des complexes haptoglobine-hémoglobine ainsi formés. Ces Hp animales se combinent molécule à molécule avec Hb comme Hp 1-1 humaine ; elles donnent avec Hb de Cheval des complexes ayant la même activité peroxydasique que celle du complexe obtenu avec Hp 1-1 humaine.

Ces résultats permettent d'affirmer que la méthode de dosage de Hp établie par JAYLE et basée sur l'activité peroxydasique du complexe est encore valable pour ces deux Hp.

DEUXIÈME PARTIE

Catabolisme des haptoglobines de Lapin et de Rat

Pour rendre compte des phénomènes observés après injection dans l'animal d'une protéine marquée, plusieurs méthodes ont été proposées. En nous inspirant d'une analyse déjà faite par MATTHEWS, nous avons établi, à partir d'un nombre limité d'hypothèses, un modèle théorique. Celui-ci confronte l'analyse théorique et mathématique des phénomènes avec l'analyse graphique des courbes obtenues expérimentalement. Nous avons ainsi pu déduire un certain nombre de relations qui permettent de calculer le taux de catabolisme de la protéine, les constantes de diffusion entre les espaces extra- et intra-vasculaires ainsi que le rapport de distribution entre ces espaces. Nous avons ensuite étudié d'autres méthodes plus empiriques, nous les avons critiquées afin d'en dégager les hypothèses implicites et nous avons cherché comment ces dernières méthodes pouvaient être ramenées à l'analyse plus générale que nous avions commencé par établir. Nous montrons ensuite l'avantage qu'elles présentent sur le plan pratique.

Pour marquer la protéine, nous avons choisi l'iode 131, isotope qui présente plusieurs avantages sur le tritium et le carbone 14.

Son rayonnement est facile à mesurer directement sans passer par l'intermédiaire de scintillateurs liquides. En outre, après catabolisme de la protéine, l'iode n'est pas réutilisé par l'organisme. Cette étude nous a conduit à utiliser les techniques suivantes :

— marquage de la protéine ;
— injection à l'animal ;
— prélèvement des échantillons sanguins et urinaires ;
— méthode de comptage ;
— examen de la partie protéique radioactive.

Nous avons constaté que leur emploi nécessite un certain nombre de précautions que nous avons mises au point.

Nous avons injecté au Lapin et au Rat une haptoglobine marquée par ^{131}I et suivi la radioactivité plasmatique pendant deux semaines. Au cours des quatre ou cinq premiers jours, la radioactivité plasmatique décroît rapidement puis devient linéaire en coordonnées semi-logarithmiques. La partie linéaire nous a permis de calculer une demi-vie de 4 ± 0,4 jours chez le Lapin et de 2 ± 0,2 jours chez le Rat.

Le marquage par l'iode dénature en partie l'haptoglobine qui est une molécule extrêmement fragile. La chute rapide de la radioactivité plasmatique dans les premiers jours est due en grande partie à l'élimination par l'animal des molécules dénaturées. Pour les exclure, nous avons utilisé le procédé du « filtrage ». Il consiste à injecter la préparation de Hp marquée à un premier animal qui au bout de quatre ou cinq jours élimine de son organisme les protéines dénaturées. Cet animal est alors saigné et, du plasma, l'haptoglobine marquée ainsi purifiée est isolée et injectée ensuite à d'autres animaux. Grâce à cette technique, nous avons pu étudier le phénomène de diffusion de la protéine marquée du compartiment intra-vasculaire dans les espaces extra-vasculaires. Nous avons ainsi déterminé le taux relatif de catabolisme intra-vasculaire et le rapport de distribution EV/iV. Ces valeurs sont :

	Lapin	*Rat*
Taux partiel de catabolisme iV	54 % ± 5 %	78 % ± 5 %
Rapport de distribution EV/iV :		
— Méth. d'anal. compartimentale	1,15	0,7
— Méth. du temps d'équilibre	1,15	0,75-0,80

Nous ne connaissons pas avec certitude le lieu du catabolisme de Hp, mais il est vraisemblable qu'il est en connexion étroite avec l'espace iV.

L'haptoglobine est dégradée dans l'organisme au niveau des acides aminés qui sont excrétés tels quels ou sous une forme de dégradation ultérieure.

Note 1

Dosage des haptoglobines

- PRINCIPE :

En présence d'hydroperoxyde d'éthyle, le complexe Hp-Hb oxyde une solution d'iodure de potassium, dans des conditions déterminées de pH et de température. L'iode libéré est dosé par une solution d'hyposulfite de sodium.

- APPAREIL ET RÉACTIFS :

L'appareil utilisé pour le dosage se compose d'un bain-marie maintenu à 32° dans lequel plongent deux creusets en porcelaine.

Les réactifs employés sont les suivants :

— hémoglobine de cheval M/80.000;
— hydroperoxyde d'éthyle N/10;
— tampon acétate de sodium N/10 pH 4,4;
— iodure de potassium N/10;
— iode N/100;
— hyposulfite de sodium N/100.

- TECHNIQUE :

Dans le premier creuset, on verse 0,1 ml d'une solution d'hémoglobine de cheval M/80.000, un volume de sérum à doser inférieur à 0,1 ml et 3 ml d'iodure de potassium.

Dans le second creuset, on verse 1 ml de la solution d'hydroperoxyde d'éthyle, 10 ml de tampon acétate de sodium et 0,5 ml d'iode destiné en partie à inhiber l'activité peroxydasique de l'hémoglobine seule.

On verse le contenu du second creuset dans le premier. On déclenche le chronomètre et au bout de 4 mn 30 s, on commence à doser l'iode libéré à partir de l'iodure de potassium, par de l'hyposulfite de sodium en présence

d'empois d'amidon. Soit V_h le volume versé. Le dosage doit être terminé en 30 secondes, c'est-à-dire à la fin de la cinquième minute.

On recommence un dosage identique en absence de sérum. La quantité d'hyposulfite utilisée pour doser l'iode libéré est alors de $V_t = 0{,}75$ ml. C'est la valeur témoin.

Portons en abscisses des volumes croissants d'un même sérum et en ordonnées les quantités $V_h - V_t$ d'hyposulfite versé pour doser l'iode libéré par les complexes Hp-Hb. Pour un volume de sérum inférieur à V_s, il y a proportionnalité entre les volumes $V_h - V_t$ et les quantités de sérum utilisées pour le dosage. Pour un volume de sérum supérieur à V_s, la quantité d'hyposulfite $H = V_h - V_t$ est constante et égale à 2 ml.

La quantité de Hp contenue dans la prise d'essai V_s sature donc 0,1 ml de Hb M/80.000, c'est-à-dire :

$$0{,}1 \times \frac{68.000}{80.000} \text{ mg de Hb}$$

Comme on sait que 85.000 g de Hp (cas de Hp 1-1 humaine) saturent 68.000 g de Hb, la quantité de Hp contenue dans le volume V_s est de :

$$\frac{85.000}{68.000} \times 0{,}1 \times \frac{68.000}{80.000} \text{ mg de Hp}$$

En divisant cette quantité par le volume V_s exprimé en ml, on déduit la teneur du sérum en Hp en mg par ml.

Pour les Hp de Lapin et de Rat, on remplace 85.000 par le poids moléculaire correspondant.

Dans la pratique, le dosage revient à déterminer le volume V_s d'un sérum donné qui contient la quantité de Hp nécessaire et suffisante pour saturer 0,1 ml de Hb M/80.000. Il n'est pas nécessaire de le déterminer par tâtonnement.

Soit V_x le volume de la prise d'essai du sérum à doser. Soit h la différence $V_h - V_t$ en ml entre le volume d'hyposulfite versé lors du dosage et la valeur témoin. On peut écrire :

$$\frac{V_x}{V_s} = \frac{h}{H}$$

V_x est connu, H est constant et égal à 2 ml, h est mesuré. On en déduit V_s, et de là la teneur en Hp du sérum en mg par ml.

Note 2

Calcul du gradient de concentration obtenu à l'aide de deux récipients identiques

Soit V_0 le volume total initial du tampon contenu dans les deux récipients (*fig. 23*).

Désignons par C_1 et C_2 les concentrations respectives du récipient « mélangeur » et du récipient « réservoir ».

Au bout d'un temps t, V_0 est devenu égal à V et la concentration dans le récipient mélangeur est passée de C_1 à x.

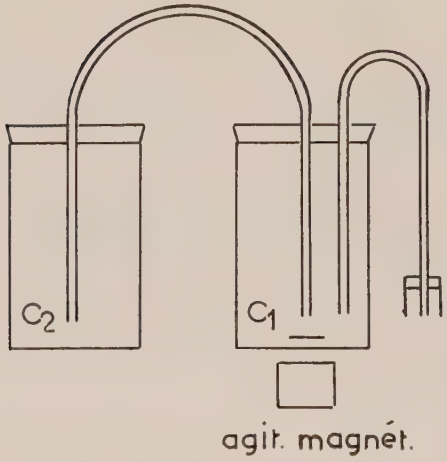

FIG. 23 : Dispositif à récipients communicants pour l'obtention d'un gradient linéaire de concentration

Pendant le temps dt, il s'écoule un volume dv.

Ecrivons que la quantité totale de sel présente dans les deux récipients avant dt est égale à celle qui reste après dt dans les deux récipients plus celle contenue dans le volume dv écoulé.

$$VC_2 + V_x = (V - dv)(x + dx) + 2\,dv\,(x + dx)$$

Après simplification, on a :

$$\frac{dv}{V} = \frac{dx}{C_2 - x}$$

Après intégration :

$$\text{Log } V = \text{Log } (C_2 - x) + K$$

$$K = \text{Log } \frac{V_0}{C_2 - C_1}$$

d'où :

$$\frac{V}{V_0} = \frac{C_2 - x}{C_2 - C_1}$$

Si V_e désigne le volume écoulé, on a :

$$V_e = V_0 - V$$

$$V_e = \frac{V_0}{C_2 - C_1} (x - C_1)$$

d'où :

$$x = C_1 + \frac{V_e (C_2 - C_1)}{V_0}$$

Note 3

Analyse compartimentale : calcul des constantes (C) et des constantes de vitesses (k)

Pour le système particulier à trois compartiments tel que nous l'avons envisagé (*fig. 11*), nous obtenons l'ensemble suivant d'équations différentielles :

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_1 X_1 + k_{31} X_3 \qquad (1)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12} X_1 \qquad (2)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_3 X_1 - k_{31} X_3 \qquad (3)$$

où :

$$k_1 = k_{12} + k_{13}$$

Par hypothèse, on a à tout instant :

$$X_1 + X_2 + X_3 = 1$$

au temps $t = 0$
$X_1 = 1$
$X_2 = X_3 = 0$

au temps $t = \infty$
$X_1 = X_3 = 0$
$X_2 = 1$

Les solutions générales des équations (1) et (3) sont :

$$X_1 = C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t} + D_1 \qquad (4)$$

$$X_3 = C_5 e^{-b_1 t} + C_6 e^{-b_2 t} + D_3 \qquad (5)$$

Puisque $X_2 = 1 - X_1 - X_3$, on a également :

$$X_2 = 1 - (C_1 + C_5)\ e^{-b_1 t} - (C_2 + C_6)\ e^{-b_2 t} - (D_1 + D_3) \qquad (6)$$

Posons :

$$C_3 = C_1 + C_5$$
$$C_4 = C_2 + C_6$$
$$D_2 = D_1 + D_3$$

Aux limites :
Pour $t \longrightarrow \infty$, on a :

$$X_1 = X_3 = 0\ ;\ \text{donc}\ D_1 = D_3 = 0 = D_2$$

Pour $t = 0$, on a :

$$X_1 = C_1 + C_2 = 1 \qquad C_2 = 1 - C_1$$
$$X_2 = 1 - C_3 - C_4 = 0 \qquad C_4 = 1 - C_3$$
$$X_3 = C_5 + C_6 = 0 \qquad C_6 = - C_5$$

Les équations (4), (5) et (6) deviennent :

$$X_1 = C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t} \qquad (7)$$
$$X_3 = C_5 e^{-b_1 t} - C_5 e^{-b_2 t} \qquad (8)$$
$$X_2 = 1 - C_3 e^{-b_1 t} - C_4 {}^{-b_2 t} \qquad (9)$$

- VALEURS DES CONSTANTES C_x EN FONCTION DE (b) ET DE (k) :

Dérivons les fonctions (7) et (8) :

$$\frac{dX_1}{dt} = - C_1 b_1 e^{-b_1 t} - C_2 b_2 e^{-b_2 t} \qquad (10)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = - C_5 b_1 e^{-b_1 t} + C_5 b_2 e^{-b_2 t} \qquad (11)$$

En remplaçant, dans les équations (1) et (3), X_1 et X_3 par leur valeur tirée des équations (7) et (8), on obtient :

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_1 [C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t}] + k_{31} [C_5 e^{-b_1 t} - C_5 e^{-b_2 t}] \quad (12)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13} [C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t}] - k_{31} [C_5 e^{-b_1 t} - C_5 e^{-b_2 t}] \quad (13)$$

Des équations (10) et (12) d'une part, des équations (11) et (13) d'autre part, on obtient :

$$-C_1 b_1 = -k_1 C_1 + k_{31} C_5 \quad (14)$$

$$-C_5 b_1 = +k_{13} C_1 - k_{31} C_5 \quad (15)$$

(14) et (15) peuvent s'écrire :

$$-(k_1 - b_1) C_1 + k_{31} C_5 = 0 \quad (16)$$

$$k_{13} C_1 - (k_{31} - b_1) C_5 = 0 \quad (17)$$

Pour que ces deux équations en C_1 et en C_5 aient d'autres solutions que la solution nulle, il est nécessaire et suffisant que le déterminant :

$$\begin{vmatrix} -k_1 + b_1 & k_{31} \\ k_{13} & -k_{31} + b_1 \end{vmatrix} = 0$$

En évaluant le déterminant, on obtient une équation du second degré en b_1 :

$$b^2_1 - (k_1 + k_{31}) b_1 + k_{12} k_{31} + (k_{13} k_{31} - k_{13} k_{31}) = 0$$

En n'admettant pour racines que des valeurs réelles, on a :

$$b_1 + b_2 = k_1 + k_{31} \quad (18)$$

$$b_1 \cdot b_2 = k_{12} \cdot k_{31} \quad (19)$$

De (11) et (13), on obtient également :

$$k_{13} C_2 + (k_{31} - b_2) C_5 = 0 \quad (20)$$

D'où :

$$C_5 = \frac{-k_{13}C_2}{k_{31} - b_2} = \frac{-k_{13}(1 - C_1)}{k_{31} - b_2} \qquad (21)$$

De (17), on tire :

$$C_5 = \frac{k_{13}C_1}{k_{31} - b_1} \qquad (22)$$

Les équations (21) et (22) donnent deux expressions différentes de C_5. En les égalant, on obtient :

$$\frac{k_{13}C_1}{k_{31} - b_1} = \frac{-k_{13}}{k_{31} - b_2}(1 - C_1)$$

d'où :

$$C_1 = \frac{k_{31} - b_1}{b_2 - b_1} \qquad (23)$$

$$C_2 = \frac{k_{31} - b_2}{b_1 - b_2} \qquad (24)$$

De (22) et (23), on tire :

$$C_5 = -C_6 = \frac{k_{13}}{b_2 - b_1} \qquad (25)$$

L'équation (6) peut s'écrire :

$$1 - X_2 = C_3 e^{-b_1 t} + C_4 e^{-b_2 t} \qquad (26)$$

Après dérivation, on obtient :

$$-\frac{dX_2}{dt} = -C_3 b_1 e^{-b_1 t} - C_4 b_2 e^{-b_2 t} \qquad (27)$$

De (2) et de (7), on tire :

$$-\frac{dX_2}{dt} = -k_{12}\,[C_1e^{-b_1t} + C_2e^{-b_2t}] \qquad (28)$$

En rapprochant (27) et (28), on obtient :

$$C_3b_1 = k_{12}C_1$$
$$C_4b_2 = k_{12}C_2$$

d'où :

$$C_3 = \frac{k_{12}C_1}{b_1} = \frac{k_{12}\,(k_{31} - b_1)}{b_1\,(b_2 - b_1)} \qquad (29)$$

$$C_4 = \frac{k_{12}C_2}{b_2} = \frac{k_{12}\,(k_{31} - b_2)}{b_2\,(b_1 - b_2)} \qquad (30)$$

- VALEURS DES CONSTANTES (k) EN FONCTION DE C_1, C_2 ET b_1, b_2 :

De (23), on tire la valeur de k_{31} :

$$k_{31} = C_1b_2 + C_2b_1 \qquad (31)$$

De (19) et (31), on tire la valeur de k_{12} :

$$k_{12} = \frac{1}{\frac{C_1}{b_1} + \frac{C_2}{b_2}} \qquad (32)$$

Après un temps $T > t_2$, les termes en b_2 des équations (7), (8) et (9) deviennent négligeables. On a en effet $-b_2 > -b_1$.

Ces équations deviennent après un temps T :

$$X_1 = C_1e^{-b_1t} \qquad (33)$$
$$X_3 = C_5e^{-b_1t} \qquad (34)$$
$$1 - X_2 = C_3e^{-b_1t} \qquad (35)$$

En tenant compte de (25) et (29), on obtient les égalités suivantes :

$$\frac{X_3}{X_1} = \frac{C_5}{C_1} = \frac{k_{13}}{k_{31} - b_1} \tag{36}$$

$$\frac{1 - X_2}{X_1} = \frac{X_1 + X_3}{X_1} = \frac{C_3}{C_1} = \frac{k_{12}}{b_1} \tag{37}$$

d'où :

$$k_{13} = \frac{k_{12} - b_1}{b_1} (k_{31} - b_1) \tag{38}$$

En remplaçant k_{12} et k_{31} par leur valeur donnée par les équations (32) et (31), on obtient :

$$k_{13} = \frac{C_1 C_2 (b_2 - b_1)^2}{C_1 b_2 - C_2 b_1} \tag{39}$$

BIBLIOGRAPHIE

1. Baitsch (H.). — Zur Kenntnis der Haptoglobin-Typen einiger Cercopithecinae. (*Anthropol. Anz., Dtsch.*, 1960, **24**, 69.)

2. Beckman (L.) et Cedermark (G.). — Haptoglobin types in Macaca irus. (*Nature*, 1960, **186**, 643.)

3. Beaton (G.H.), Selby (A.E.) et Wright (A.M.). — Starch Gel electrophoresis of rat serum proteins. (*J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2001.)

4. Beeken (W.L.), Volwiller (W.), Goldsworthy (P.D.), Garby (L.E.), Reynolds (W.E.), Stogsdill (R.) et Stemler (R.S.). — Studies of ^{131}I-Albumin catabolism and distribution in normal young male adults. (*J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 1312.)

5. Berson (S.A.), Yalow (R.S.), Schreiber (S.S.) et Post (J.). — Tracer experiments with ^{131}I-labelled human serum albumin : distribution and degradation studies. (*J. Clin. Invest.*, 1953, **32**, 746.)

6. Berson (S.A.) et Yalow (R.S.). — The distribution of ^{131}I-labelled human serum albumin introduced into ascitic fluid. Analysis of the kinetics of a three compartment catenary transfer system in man and speculation on possible sites of degradation. (*J. Clin. Invest.*, 1954, **33**, 377.)

7. Binette (H.P.), Mc Nair (M.B.) et Calkins (E.). — Fractionation and characterization of normal rabbit plasma proteins. (*Biochem. J.*, 1965, **94**, 143.)

8. Bird (R.) et Jackson (D.J.). — A routine method for the estimation of serum protein-bound iodine. (*Clin. Chem.*, 1962, **8**, 389.)

9. Blix (C.). — Determination of hexosamines according to Elson et Morgan. (*Acta Chem. Scand.*, 1948, **2**, 467.)

10. Boffa (G.A.) et Fine (J.-M.). — Les constituants protéiques du sérum de Rat. I. Electrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon. II. Analyse immuno-électrophorétique. (*Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1962, **7**, 813 et 822.)

11. Borel (J.), Dobryszycka (W.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Vitesse de renouvellement de l'haptoglobine plasmatique chez le Lapin. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **45**, 203.)

12. Borel (J.-P.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Elimination urinaire des substances radioactives après injection d'haptoglobine ^{131}I. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 549.)

13. Buettner-Janusch (J.V.) et Sale (J.B.). — Plasma proteins and hemoglobins of the African Elephant and the hyrax. (*Nature*, 1964, **201**, 510.)

14. Campbell (R.M.), Cuthbertson (D.P.), Matthews (C.M.) et Mc Farlane (A.S.). — Behavior of ^{14}C and ^{131}I-labelled plasma proteins in the Rat. (*Int. J. Appl. Rad. Isot.*, 1956, **1**, 66.)

15. Cheftel (R.I.), Cloarec (L.). — Contribution à l'étude de la structure chimique de l'haptoglobine humaine. (*C.R. Acad. Sci.*, 1962, **254**, 1694.)

16. Cheftel (R.I.), Cloarec (L.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Structure des glycopeptides obtenus par protéolyse de Hp humaine. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 385.)

17. Cheftel (R.I.), Cloarec (L.), Moretti (J.), Rafelson (M.) et Jayle (M.-F.). — Etude de l'haptoglobine. III. Composition chimique de la partie glucidique. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, **42**, 993.)

18. Cloarec (L.). — Contribution à l'étude physico-chimique des Hp humaines. (*Thèse Doct. Sci. Phys.*, Paris, Impr. R. Foulon, 1960.)

19. Cloarec (L.) et Moretti (J.). — Etude comparative des méthodes de préparation des Hp humaines. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 21.)

20. Cloarec (L.), Moretti (J.) et Rafelson (M.). — Composition chimique de l'haptoglobine humaine. (*C.R. Acad. Sci.*, 1963, **257**, 983.)

21. Cohen (S.), Freeman (T.) et Mc Farlane (A.S.). — Metabolism of ^{131}I-labelled human albumin. (*Clin. Sc.*, 1961, **20**, 161.)

22. Cohen (S.), Holloway (R.C.), Matthews (C.M.E.) et Mc Farlane (A.S.). — Distribution and elimination of ^{131}I and ^{14}C-labelled plasma proteins in the Rabbit. (*Biochem. J.*, 1956, **62**, 143.)

23. Cornfield (J.), Steinfeld (J.) et Greenhouse (S.W.). — Models for the interpretation of experiments using tracer compounds. (*Biometrics*, 1960, **16**, 212.)

24. Dautrevaux (M.). — Dosage des acides aminés par une méthode automatique dérivée de celle de Piez et Morris. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **44**, 1105.)

25. Dische (Z.). — Uber einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsaüre und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Realktionen. (*Mikrochemie*, 1930, **8**, 4.)

26. Dische (Z.) et Shettles (L.B.). — A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. (*J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 595.)

27. Dobryszycka (W.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Séparation spécifique de l'haptoglobine sérique sous forme de complexe hémoglobinique. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **45**, 301.)

28. Elson (A.L.) et Morgan (W.T.). — A colorimetric method for determination of glucosamine and chondrosamine. (*Biochem. J.*, 1933, **27**, 1824.)

29. Escribano (M.J.) et Grabar (P.). — L'analyse immunoélectrophorétique du sérum de rat normal. (*C.R. Acad. Sci.*, 1962, **255**, 206.)

30. Espinosa (E.). — Starch-gel electrophoresis of rat-serum proteins. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **48**, 445.)

31. Friedberg (W.), Abbott (J.K.) et Friedberg (M.A.). — The relationship between the pool size and rate of catabolism of albumin. (*Fed. Proc.*, 1962, **21**, 76.)

32. Guinand (S.), Tonnelat (J.), Boussier (G.) et Jayle (M.-F.). — Propriétés physico-chimiques de l'haptoglobine, séromucoïde α_2 et de sa combinaison hémoglobinique. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, **38**, 329.)

33. Haney (J.F.B.) et Lissitzky (S.). — Presence of the 3-mono- and 3,5 diiodo derivatives of 4-hydroxyphenylpyruvic acid in rat thyroid glands. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **63**, 557.)

34. Hemmings (W.A.) et Jones (R.E.). — Combination analysis of rabbit serum proteins, using high-resolution Porath zone electrophoresis and starch-gel electrophoresis. (*Nature*, 1963, **197**, 695.)

35. Herman-Boussier (G.). — Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines humaines. (*Thèse Doct. Sci. Phys.*, Paris, 1960, Impr. R. Foulon, 1960.)

36. Herman-Boussier (G.), Cloarec (L.) et Cheftel (R.I.). — Propriétés physico-chimiques et constitution des haptoglobines. (*Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1962, **2**, 455.)

37. Herman-Boussier (G.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Etude de l'haptoglobine. I. Préparation des haptoglobines humaines des types I et II. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 817.)

38. Herman-Boussier (G.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Etude de l'haptoglobine. II. Propriétés physiques et chimiques des haptoglobines des types I et II et de leurs complexes avec l'hémoglobine. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 837.)

39. Hesselholt (M.). — Haptoglobin polymorphism in pigs. (*Acta Vet. Scand.*, 1963, **4**, 238.)

40. Jayle (M.-F.). — Etude biochimique et physiopathologique des peroxydases animales. (*Thèse*, Paris, 1939. Impr. M. Declume, 1939.)

41. Jayle (M.F.). — Evaluation moléculaire de l'haptoglobine par une réaction enzymatique de peroxydation. (*C.R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 574.)

42. Jayle (M.-F.). — Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 876.)

43. Jayle (M.-F.) et Boussier (G.). — Obtention à l'état homogène d'une mucoprotéine sérique, l'haptoglobine. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, **36**, 959.)

44. Jayle (M.-F.), Boussier (G.) et Tonnelat (J.). — Isolement à partir du sérum humain de la combinaison hémoglobine-haptoglobine à l'état homogène. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, **38**, 343.)

45. Jayle (M.-F.) et Dorman (E.). — Variations physiopathologiques de l'haptoglobine. (*Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1962, **2**, 490.)

46. Jayle (M.-F.) et Gillard (P.). — Précipitation saline d'une protéine définie dans un mélange hétérogène. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 149.)

47. Katz (J.), Bonorris (G.) et Sellers (A.L.). — Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats. (*J. Lab. and Clin. Med.*, 1963, **62**, 910.)

48. Lewallen (C.G.), Berman (M.) et Rall (J.E.). — Studies of iodoalbumin metabolism. I. A mathematical approach of the kinetics. (*J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 66.)

49. Lissitzky (S.), Bismuth (J.) et Simon (C.). — Absence of free iodotyrosines from the plasma of the rat. (*Nature*, 1963, **199**, 1002.)

50. Lombart (C.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Préparation et propriétés physiques des haptoglobines de Lapin et de Rat. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **97**, 262.)

51. Lombart (C.), Dautrevaux (M.) et Moretti (J.). — Composition chimique des haptoglobines de Lapin et de Rat. (*Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **97**, 270.)

52. Mc Farlane (A.S.). — Labelling of plasma proteins with radioactive iodine. (*Biochem. J.*, 1956, **62**, 135.)

53. Mc Farlane (A.S.). — Use of labelled plasma proteins in the study of nutritional problems. (*Prog. in Biophys.*, 1957, **7**, 115.)

54. Mc Farlane (A.S.). — The behavior of ^{131}I-labelled plasma proteins *in vivo*. (*Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1957, **70**, 19.)

55. Mc Farlane (A.S.). — *In vivo* behavior of ^{131}I fibrinogen. (*J. Clin. Invest.*, 1963, **42**, 346.)

56. Mc Farlane (A.S.). — Metabolism of plasma proteins. In : Mammalian protein metabolism. Vol. I, chap. 8. (Acad. Press, 1964.)

57. Marnay (A.) et Jayle (M.-F.). — Préparation de l'haptoglobine de Lapin et de l'haptoglobine de Cheval. (*C.R. Acad. Sci.*, 1962, **254**, 1525.)

58. Matthews (C.M.E.). — The theory of tracer experiments with ^{131}I-labelled plasma proteins. (*Phys. Med. Biol.*, 1957, **2**, 36.)

59. Mihalyi (E.) et Godfrey (J.E.). — Digestion of fibrinogen by trypsin. Kinetic studies of the reaction. (*Biochim. Biophys. Acta,* 1963, **67**, 73.)

60. Montreuil (J.) et Spik (G.). — Microdosage des glucides. (*Thèse,* Lille, 1963.)

61. Moretti (J.), Borel (J.P.), Dobryszycka (W.) et Jayle (M.-F.). — Détermination de la demi-vie de l'haptoglobine plasmatique humaine. (*Biochim. Biophys. Acta,* 1963, **69**, 205.)

62. Moretti (J.), Boussier (G.) et Jayle (M.-F.). — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse en gel d'amidon. (*Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1957, **39**, 593.)

63. Moretti (J.) et Waks (M.). — Mise en évidence et dosage des haptoglobines sériques. (*Nouv. Rev. Fr. Hématol.,* 1962, **2**, 433.)

64. Mouray (H.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Incorporation *in vivo* des acides aminés marqués dans les protéines plasmatiques du Lapin. (*C.R. Acad. Sci.,* 1964, **258**, 4871.)

65. Mouray (H.), Moretti (J.) et Jayle (M.-F.). — Biosynthèse de l'haptoglobine par perfusion du foie isolé de Lapin. (*C.R. Acad. Sci.,* 1964, **259**, 2721.)

66. Murray (R.K.) et Connell (G.E.). — Elevation of serum haptoglobin in rabbits in response to experimental inflammation. (*Nature,* 1960, **186**, 86.)

67. Neuhaus (O.W.), Havez (R.) et Biserte (G.). — The identification of rat serum proteins by zone and immunoelectrophoresis. (*Arch. Bioch. Biophys.,* 1964, **106**, 159.)

68. Piez (K.A.) et Morris (L.). — A modified procedure for the automatic analysis of amino acids. (*Anal. Biochem.,* 1960, **1**, 187.)

69. Polonovski (M.) et Jayle (M.-F.). — Existence dans le plasma humain d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine. (*C.R. Soc. Biol.,* 1938, **129**, 457.)

70. Putzeys (P.) et Brosteaux (J.). — The scattering of light in proteins solutions. (*Trans. Faraday Soc.,* 1935, **31**, 1314.)

71. Reeve (E.B.) et Bailey (H.R.). — Mathematical models describing the distribution of ^{131}I-albumin in man. (*J. Lab. and Clin. Med.,* 1962, **60**, 923.)

71 *bis.* Regoeczi (E.), Regoeczi (G.E.) et Mc Farlane (A.S.). — Relation between rate of catabolism, plasma concentration and pool size of fibrinogen. (*Arch. Ges. Physiol.,* 1964, **279**, 17.)

72. Rescigno (A.). — A contribution to the theory of tracer methods. (*Biochim. Biophys. Acta,* 1956, **21**, 111.)

73. Rimington (C.). — Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins. (*Biochem. J.,* 1940, **34**, 931.)

74. Riou (G.), Paoletti (C.) et Truhaut (R.). — Fractionnement par électrophorèse sur gel d'amidon des protéines plasmatiques des différentes espèces animales. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, **44**, 149.)

75. Schloss (B.). — Colorimetric determination of glucosamine. (*Anal. Chem.*, 1952, **23**, 1321.)

76. Schönenberg (M.), Kellner (H.), Südhof (H.) et Haupt (H.). — Zur Methodik der Hexosebestimmung in Serum proteinen mit Orcin. (*Z. Physiol. Chem.*, 1957, **309**, 145.)

77. Smithies (O.). — Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. (*Biochem. J.*, 1955, **61**, 629.)

78. Smithies (O.) et Walker (N.F.). — Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. (*Nature*, 1956, **178**, 694.)

79. Sörensen (M.) et Haugaard (G.). — Uber die Anwendbarkeit der Orcinreaktion zur Bestimmung der Art und Menge von Kohlenhydrat-Gruppen in Eiweiszstoffen. (*Biochem. Z.*, 1933, **260**, 247.)

80. Spies (J.R.) et Chambers (D.C.). — Chemical determination of tryptophan in proteins. (*Anal. Chem.*, 1949, **21**, 1249.)

81. Steinbuch (M.). — Préparation de l'haptoglobine comme sous-produit du fractionnement du plasma. In : « Proc. 8th Congr. Internation. Soc. Blood Transfus. Tokyo, 1960 ». (Basel, New York, S. Karger, 1962.)

82. Steinbuch (M.). — Les techniques d'isolement de l'haptoglobine. (*Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1962, **2**, 448.)

83. Sterling (K.). — Turnover rate of serum albumin in man as measured by ^{131}I tagged albumin. (*J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 1228.)

84. Takeda (Y.) et Reeve (E.B.). — Distribution and excretion of ^{131}I-iodide in men on pharmacologic doses of iodides. (*J. Lab. and Clin. Med.*, 1962, **60**, 944.)

85. Uriel (J.) et Grabar (P.). — Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique en milieu gélifié. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.)

86. Vrignaud (Cl.) et Blanquet (P.). — A propos des dérivés iodés présents dans l'urine de l'animal normal. (*J. Méd. Bordeaux Sud-Ouest*, 1961, **138**, 1120.)

87. Warren (L.). — The thiobarbituric acid assay of sialic acids. (*J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 1971.)

88. Werner (I.) et Odin (L.). — On the presence of sialic acid in certain glycoproteins and gangliosides. (*Acta Soc. Med. Upsal.*, 1952, **57**, 230.)

89. Winzler (R.J.). — Determination of serum glycoprotein. In : *Methods of Biochem. Anal.*, 1955, **2**, 290. (D. Glick ed., Interscience pub.)

90. Wise (R.W.), Ballard (F.J.) et Ezekiel (E.). — Developmental changes in the plasma protein pattern of the rat. (*Comp. Biochem. Physiol.*, 1963, **9**, 23.)

91. Zizza (F.), Campbell (T.J.) et Reeve (E.B.). — The nature and rates of excretion of radioactive breakdown products of ^{131}I-albumin in the rabbit. (*J. Gen. Physiol.*, 1959, **43**, 397.)

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 11

Travaux antérieurs 13

Critères de pureté 16

Première partie

Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines de Lapin et de Rat

Chapitre I. — Préparations 21

A. — Préparation de l'haptoglobine de Lapin 21

1) *Matériel* 21

2) *Technique* 23

3) *Résultats* 23

B. — Préparation de l'haptoglobine de Rat 25

1) *Matériel* 25

2) *Essais négatifs de l'isolement de Hp de Rat* 27

3) *Technique adoptée* 28

4) *Résultats* 29

C. — Conclusion 32

Chapitre II. — Propriétés physiques 33

1) Coefficient d'absorbance 33

2) Points isoélectriques 34

3) Détermination du coefficient de sédimentation 35

4) Détermination du poids moléculaire 36

5) Précipitation par le sulfate d'ammonium 40

6) Composition du complexe 41

7) Activité et pureté 43

8) Application au dosage de Hp 44

Chapitre III. — Constitution chimique des haptoglobines de Lapin et de Rat 46

I. — Etude de la fraction protéique 46

A. — *Teneur en azote* 46

B. — *Teneur en protéine* 46

C. — *Composition en acides aminés* 47

1) *Technique* 47

2) *Résultats* 48

II. — Etude des glucides 50

A. — *Analyse qualitative* 50

B. — *Analyse quantitative* 51

1) *Méthode* 51

a) *Hexoses* 51

b) *Osamines* 53

c) *Dosage du fucose* 54

d) *Dosage de l'acide sialique* 56

2) *Résultats* 58

Conclusion de la première partie 59

Deuxième partie

Catabolisme des haptoglobines de Lapin et de Rat

Introduction 63

Chapitre I. — Considérations théoriques 64

I. — Définitions 64

II. — Mode d'expression des radioactivités 66

III. — Description et interprétation des faits observés 68

IV. — Méthodes de calcul 71

A. — *Analyse compartimentale* 72

B. — *Méthode du temps d'équilibre* 75

C. — *Méthode de distribution des activités* 77

D. — *Méthode de Sterling* 78

E. — *Méthode de Berson* 79

F. — *Méthode de la clearance* 82

Conclusion 83

V. — Site du catabolisme de Hp 84

Chapitre II. — Techniques expérimentales 87

I. — Technique de marquage par l'iode 131 87

A. — *Mode opératoire* 87

B. — *Analyse des produits obtenus* 88

C. — *Résultats* 90

II. — Expériences sur les animaux 91

A. — *Animaux* 91

B. — *Administration de Hp marquée* 91

C. — *Examen des plasmas* 92

D. — *Technique du screening* 93

Chapitre III. — Résultats 95

I. — Résultats obtenus sur le Lapin 95

1) *Premier type d'expérience : sans filtrage* 96

2) *Deuxième type d'expérience : filtrage de deux jours* 96

3) *Troisième type d'expérience : filtrage de six jours* 101

II. — Résultats obtenus sur le Rat 110

1) *Première étape* 110

2) *Deuxième étape* 112

III. — Produits du catabolisme 115

Conclusion de la deuxième partie 116

Résumé et conclusions 119

Note 1 122

Note 2 124

Note 3 126

Bibliographie 133

Imprimerie R. Foulon & Cie, 29, rue Deparcieux, Paris XIV^e^

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Etude biochimique des réactions lumineuses de la photosynthèse chez les plantes vertes

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN ROCHE

Vu et approuvé :
Paris, le 4 août 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
M. ZAMANSKY